

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Direktor Prof. Dr. C. Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Etablierung eines Kollagen-Kontraktionsassay
zur Untersuchung der Wirkung von Imatinib,
Nilotinib und Dasatanib auf die Kontraktionskraft
von Rattenlungenfibroblasten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Anett Kräuter

2021

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Direktor Prof. Dr. C. Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Etablierung eines Kollagen-Kontraktionsassay
zur Untersuchung der Wirkung von Imatinib,
Nilotinib und Dasatanib auf die Kontraktionskraft
von Rattenlungenfibroblasten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Anett Kräuter

2021

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Karla Lehle

2. Berichterstatter:

PD Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer

Tag der mündlichen Prüfung:

17.06.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	2
2.1	Überblick	2
2.2	Entstehung der chronischen Abstoßung/ Lungenfibrose und die Rolle der Fibroblasten	2
2.3	Kollagen als Bestandteil der extrazellulären Matrix bei der Fibrosierung.....	3
2.4	Kollagenkontraktions-Assay als in vitro-Modell der Lungenfibrose	4
2.5	Therapiemöglichkeiten der Bronchiolitis obliterans/Lungenfibrose	5
2.6	Zielstellung dieser Arbeit	6
3	Material und Methoden.....	6
3.1	Zellkultur	6
3.1.1	Auftauen von kryokonservierten Zellen.....	6
3.1.2	Passagieren von Fibroblasten	7
3.1.3	Reduktion des Zellstoffwechsels – Serumfreie Behandlung.....	7
3.1.4	Zellzahlbestimmung mittels CASY	8
3.2	Kollagenherstellung	9
3.2.1	Kollagenpräparation	9
3.2.2	Konzentrationsbestimmung vom Rohkollagen	13
3.3	Kollagen-Kontraktionsassay	18
3.3.1	Gelherstellung	18
3.3.2	Positiv- und Negativkontrollen	19
3.3.3	Variation der Bedingungen für den CGC.....	20
3.4	Wirkung von RTK-I auf die Kontraktionskraft von Fibroblasten	20
3.4.1	RTK-I im CGC.....	20
3.4.2	Herstellung von Medikamentenlösungen.....	21
3.4.3	Fluoreszenzfärbung zur Vitalitätsprüfung.....	22
3.5	Auswertung der Versuche	23
3.5.1	Image J	23
3.5.2	Statistische Auswertung mit Sigmaplot	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Kollagenpräparation	24
4.1.1	Standardisierung des Protokolls	24

4.1.2	Bilanzierung	25
4.2	Konzentrationsbestimmung	25
4.2.1	Lyophilisieren.....	25
4.2.2	Etablierung des BCA zur Konzentrationsbestimmung	27
4.2.3	SDS-Page	31
4.3	Vorüberlegungen zur Etablierung eines CGC	35
4.3.1	Passage der Zellkultur vs. Kontraktionsfähigkeit	35
4.3.2	Einfluss von Serumentzug auf die Zellvitalität	36
4.4	Etablierung eines CGC unter Verwendung von 3x NaOH.....	37
4.4.1	Vergleich Aktivierte vs. Nicht aktivierte Zellen	38
4.4.2	Zellzahl vs. Kontraktionskraft.....	39
4.4.3	Kollagenkonzentration vs. Kontraktionsstärke	40
4.4.4	Überprüfung der FKS-Variablen im CGC	42
4.5	Finales Kollagen versus Rohkollagen	43
4.5.1	Probleme bei der Verwendung von Kollagen nach 3xNaOH	43
4.5.2	Vergleich zwischen Rohkollagen, Kollagen nach 1xNaOH, Kollagen nach 3xNaOH.....	44
4.6	Etablierung des CGC unter Verwendung von Rohkollagen.....	46
4.6.1	Zeitverlauf der Kontraktionsinduktion.....	46
4.6.2	Verwendung von aktivierten- und nicht aktivierten Zellen.....	47
4.6.3	Vergleich der Vorbehandlungszeit der nicht-aktivierten Zellen	48
4.6.4	Verschiedene Zellzahlen vs. Kontraktionsstärke mit Rohkollagen	49
4.6.5	Kollagenkonzentration vs. Kontraktionsstärke mit Rohkollagen.....	51
4.6.6	Überprüfung der FKS-Variablen im Kontraktions-Assay	52
4.7	Zusammenfassung zur Etablierung eines CGC	53
4.8	Anwendung des CGC	53
4.8.1	Imatinib	54
4.8.2	Nilotinib	56
4.8.3	Dasatanib	59
5	Diskussion	63
5.1	Kollagenpräparation und Konzentrationsbestimmung	63
5.2	Etablierung des CGC	66
5.3	Verwendung von RTK-I im CGC	69
6	Anhang	73
6.1	Verwendete Materialien	73
6.2	Bildanhang	76

6.3	Messdaten	81
7	Literaturverzeichnis.....	100
8	Danksagung	105
9	Lebenslauf.....	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau Kollagenmolekül.....	4
Abbildung 2: Messprinzip der elektronischen Messungen mit CASY (Incelligence).....	9
Abbildung 3: Fotodokumentation über die Sehnenpräparation.	10
Abbildung 4: vollständiges Schema zur Präparation von Kollagen.	12
Abbildung 5: Protokoll zur Herstellung von Rohkollagen.	13
Abbildung 6: Gegenüberstellung von 2 unabhängigen Kollagen-Präparationen (C und K) an 3 verschiedenen Zeitpunkten. Darstellung der Positiv- und Negativkontrollen.	24
Abbildung 7: <u>oben:</u> Darstellung der einzelnen Gewichte der Lyophilisate in Abhängigkeit des Volumens der Coll-Stammlösung in mg als Doppelbestimmung für Kollagen in 0,1% HAc, bzw. 2% SDS. <u>Unten:</u> Ermittlung der Konzentration über die mittlere Steigung der Lyophilisate im linearen Bereich auf Grundlage der oben ermittelten Gewichte.....	26
Abbildung 8: BCA-Test.....	28
Abbildung 9: Proben 1x aufgetaut, lyophilisiert und in 0,1% HAc gelöst, Konzentrationsermittlung über die Steigung im linearen Bereich A: Einzelwerte aus einer Doppelbestimmung und Ermittlung des linearen Bereichs, B: Darstellung der Werte nach Einberechnung der mittleren Steigung aus Abb. 7 und damit Ermittlung der Konzentration in mg/ml, C: alle Einzelwerte wurden gemittelt und anhand der Steigung die Konzentration der Stammlösung ermittelt.	29
Abbildung 10: Proben 1x aufgetaut, lyophilisiert und in 2% SDS gelöst, Konzentrationsermittlung über die Steigung im linearen Bereich A: Einzelwerte aus einer Doppelbestimmung und Ermittlung des linearen Bereichs, B: Darstellung der Werte nach Einberechnung der mittleren Steigung aus Abb. 7 und damit Ermittlung der Konzentration in mg/ml, C: alle Einzelwerte wurden gemittelt und anhand der Steigung die Konzentration der Stammlösung ermittelt.	30
Abbildung 11: Standardkurve von gekauften Kollagen-Typ-1 (Coll_R) und selbst hergestelltem Kollagen-Typ-1 (Coll-SL).	31
Abbildung 12: SDS-Page mit Coomassiefärbung. Standardkurve der selbst hergestellten Kollagenstammlösung.....	32
Abbildung 13: Standardkurve. Gegenüberstellung der eingesetzten Konzentration gegen die Bandenintensität (aller 4 Kollagenbanden im Coomassie-Gel).	32
Abbildung 14: Kollagengehalt im SDS-Page/ Coomassie, Vergleich aus 3 Präparationen (3 Beobachter: K; C; A).....	33

Abbildung 15: Densitometrische Auswertung des Gels aus Abbildung 14.....	34
Abbildung 16: Vergleich der Kontraktionskraft der Positiv- und Negativkontrollen vs. Passagenabhängigkeit. <u>Links</u> = Positivkontrollen, <u>rechts</u> : Negativkontrollen.....	35
Abbildung 17: MTS-Test mit Fibroblasten zur Untersuchung der Proliferationshemmung...	37
Abbildung 18: Einfluss von FKS im Überstand bei aktivierten- und nicht aktivierten Fibroblasten auf die Kontraktionskraft. <u>Links</u> : aktivierte Fibroblasten. <u>Rechts</u> : nicht-aktivierte Fibroblasten.....	38
Abbildung 19: Vergleich der Kontraktionsstärke in Abhängigkeit der Zellzahl.....	40
Abbildung 20: Vergleich der Kontraktionsstärke in Abhängigkeit der Kollagenkonzentration.	41
Abbildung 21: Vergleich verschiedener FKS-Varianten auf die Kontraktionskraft nicht aktivierter Zellen.	43
Abbildung 22: dünne Gelbildung bei Positiv- (obere Reihe) und Negativkontrollen (untere Reihe) mit Kollagen nach 1xNaOH und 3xNaOH.....	44
Abbildung 23: Auswertung der Positiv- und Negativkontrollen für Kollagen nach 3xNaOH (A), nach 1x NaOH (B) und Rohkollagen (C).	45
Abbildung 24: Zeitverlauf der Kontraktion über 24h.....	47
Abbildung 25: Vergleich der Kontraktionsstärke bei den Positiv- und Negativkontrollen. <u>Links</u> : aktivierte Zellen. <u>Rechts</u> : nicht-aktivierte Zellen.....	48
Abbildung 26: Vergleich Kontraktionsspanne von Fibroblasten nach 4- bzw. 24h serumfreier Vorbehandlung.	49
Abbildung 27: Vergleich der Kontraktionsstärke in Abhängigkeit der Zellzahl mit Rohkollagen	50
Abbildung 28: Vergleich der Kontraktionsstärke in Abhängigkeit der Kollagenkonzentration mit Rohkollagen.	51
Abbildung 29: Vergleich verschiedener FKS-Variablen auf die Kontraktionskraft nicht-aktivierter Zellen mit Rohkollagen.....	52
Abbildung 30: Vergleich der Kontraktionshemmung Imatinib vs. Kontrollen im CGC.....	54
Abbildung 32: CGC Imatinib vs. Positiv- und Negativkontrollen	55
Abbildung 33: Imatinib: Fluoreszenzfärbung mit Dapi und Calcein zur Vitalitätsprüfung ...	56
Abbildung 34: Vergleich der Kontraktionshemmung Nilotinib vs. Kontrollen im CGC.....	56
Abbildung 36: CGC Nilotinib vs. Positiv- und Negativkontrollen.....	57
Abbildung 37: Nilotinib: Fluoreszenzfärbung mit Dapi und Calcein zur Vitalitätsprüfung ..	58
Abbildung 38: Vergleich der Kontraktionshemmung Dasatinib vs. Kontrollen im CGC	59

Abbildung 39: Bildliche Darstellung des CGC zu Abbildung 38.....	60
Abbildung 40: CGC Dasatanib vs. Positiv- und Negativkontrollen.	60
Abbildung 41: Dasatanoib: Fluoreszenzfärbung mit Dapi und Calcein zur Vitalitätsprüfung.	61
Abbildung 42: EC ₅₀ -Kurve Dasatanib	62
Abbildung 43: denaturiertes Kollagen durch zu kräftiges Rühren in der Kühlkammer	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung Lämmli-puffer.....	16
Tabelle 2: Zusammensetzung der Fixierlösung.....	16
Tabelle 3: Zusammensetzung der Färbelösung.	16
Tabelle 4: Zusammensetzung der Entfärbelösung.	16
Tabelle 5: Pipettierschema Trenngel.	17
Tabelle 6: Pipettierschema Sammelgel.	17
Tabelle 7: Pipettierschema CGC (Herstellerprotokoll ibidi cell focus).	19
Tabelle 8: Herstellung der Stammlösung.	21
Tabelle 9: Konzentrationen der Medikamente in μM für den Versuch.	21
Tabelle 10: Herstellung von L1.....	22
Tabelle 11: Herstellung der unterschiedlichen Verdünnungen.	22
Tabelle 12: Ergebnisse einer Kollagenpräparation von 3 unabhängigen Beobachtern zu einem Zeitpunkt.	25
Tabelle 13: Verdünnungsreihe, Standardkurve.	32
Tabelle 14: Daten zu Abbildung 16; Positivkontrollen.....	36
Tabelle 15: Daten zu Abbildung 16; Negativkontrollen	36
Tabelle 16: Daten zu Abbildung 18	39
Tabelle 17: Daten zu Abbildung 19	40
Tabelle 18: Daten zu Abbildung 20.	41
Tabelle 19: Daten zu Abbildung 21, $p < 0,001$	43
Tabelle 20: Daten zu Abbildung 23 $p < 0,001$	46
Tabelle 21: Daten zu Abbildung 25, $p < 0,001$	48
Tabelle 22: Daten zu Abbildung 26, $p < 0,001$	49
Tabelle 23: Daten zu Abbildung 27.	51
Tabelle 24: Daten zu Abbildung 28.....	51
Tabelle 25: Daten zu Abbildung 29. $p < 0,001$	52
Tabelle 26: Daten zu Abbildung 30. Keine Statistik bei $n=2$	54
Tabelle 27: Daten zu Abbildung 32.	55
Tabelle 28: Daten zu Abbildung 34. Keine Statistik bei $n=2$	57
Tabelle 29: Daten zu Abbildung 36.	58
Tabelle 30: Daten zu Abbildung 38. Keine Statistik bei $n=2$	59
Tabelle 31: Daten zu Abbildung 40.	61

1 Zusammenfassung

Die Lungentransplantation ist die einzige etablierte kurative Therapie für Patienten mit nicht malignen Lungenerkrankungen im Endstadium. Eine häufige Komplikation ist die Entstehung einer Bronchiolitis obliterans, bei der es zu narbig-fibrotischen Umbauvorgängen insbesondere der kleinen Atemwege und des Lungeninterstitiums kommt. Daher stehen Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (=RTK-I) als antifibrotische Wirkstoffe im Fokus der Forschung. In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der RTK-I Imatinib, Nilotinib und Dasatanib auf die Kontraktionskraft von Rattenlungenfibroblasten untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein Protokoll zur Kollagenherstellung und ein Kollagen-Kontraktionsassay (=CGC) mit entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen etabliert.

Im CGC wurden die Fibroblasten mit Imatinib (100 μ M; 20 μ M), Nilotinib (40 μ M; 20 μ M) und Dasatanib (10 μ M; 5 μ M; 2,5 μ M; 1 μ M; 0,5 μ M und 0,1 μ M) inkubiert. Nach 24h wurde die Fläche und damit das Kontraktionsausmaß bestimmt und mit den Positiv- und Negativkontrollen verglichen. Bei Imatinib kam es bei beiden Konzentrationen zu einer Kontraktion. In der Vitalitätsfärbung mit Dapi und Calcein sahen wir allerdings nahezu keine vitalen Zellen. Der zytotoxische Effekt steht bei diesen Konzentrationen im Vordergrund. Bei Nilotinib sahen wir ein ähnliches Ergebnis. Die Zellen waren hier noch vital – die fehlende Kontraktionshemmung liegt möglicherweise in einer zu niedrigen Konzentration von Nilotinib. Unter Dasatanib beobachteten wir eine dosisabhängige Kontraktionshemmung. Die maximale Hemmung erreichten wir bei 10 μ M (57,9% \pm 9,8; positiv: 21,8% \pm 4,9; 43,0% \pm 11,2). Die mittlere Hemmkonzentration EC₅₀ lag bei 2,4 μ M. Die Zellen waren bei allen Konzentrationen ausreichend vital. Dasatanib zeigte in unserer Studie in Abhängigkeit der Dosierung die stärkste Kontraktionshemmung. In der Anwendung ist dieses Medikament gut steuerbar und hat, wie aus der Literatur bekannt, eine positive Wirkung auf senescente Zellen, die unter Dasatanib abgetötet werden (hier nicht untersucht). Demnach könnte diesem Medikament eine wichtige Bedeutung in der Behandlung fibrotischer Erkrankungen, bzw. in unserem Fall, der Bronchiolitis obliterans zukommen.

2 Einleitung

2.1 Überblick

Die Lungentransplantation (LuTx) ist die einzige etablierte kurative Therapie für Patienten mit nicht malignen Lungenerkrankungen im Endstadium. Das 5-Jahresüberleben liegt bei 50 % und ist somit schlechter als bei Herz-, Nieren- oder Lebertransplantationen (Bos et al., 2020). Eine wesentliche Ursache dafür ist die chronische Transplantatdysfunktion (CLAD, chronic lung allograft dysfunction), die klinisch nur schwer zu erfassen ist. Nach 5 Jahren sind ca. 50 % der Lungentransplantierten davon betroffen (Bos et al., 2020). Die Pathogenese der CLAD ist komplex (Hsiao et al., 2017; Wohlschlaeger et al., 2019). CLAD beschreibt verschiedene Ausprägungen der chronischen Abstoßung (BOS, Bronchiolitis Obliterans Syndrom; RAS, Restrictive Allograft Syndrom). Insbesondere das BOS geht mit einer verschlechterten Lungenfunktion als Folge einer Obstruktion der kleinen Atemwege einher. Es kommt dabei zu narbigen Veränderungen der kleinen Atemwege (BO, Bronchiolitis obliterans), der Gefäße (Vaskulopathie) und bei starken Abstoßungen auch zu einer Fibrosierung des interstitiellen Gewebes (Wohlschlaeger et al., 2019). Histopathologische Untersuchungen zeigen, dass BO-Läsionen aus initialen inflammatorischen Veränderungen mit Epithelschädigung und konsekutiver ECM-Ablagerung hervorgehen. Dieser Prozess ist progressiv und führt letztlich zu einer narbigen Fibrose (Wohlschläger et al., 2019). Bei der RAS hingegen entsteht v.a. eine alveoläre Fibroelastose. Diese wird durch eine flächenhafte intraalveoläre Kollagenablagerung mit diskreter Entzündung und einer dominanten Elastose in den eingemauerten, ehemaligen Alveolarwänden hervorgerufen (Wohlschläger et al., 2019).

2.2 Entstehung der chronischen Abstoßung/ Lungenfibrose und die Rolle der Fibroblasten

Normalerweise kommt es bei der Wundheilung nach einer Schädigung des Alveolarepithels zur Rekrutierung von Makrophagen und anderen Immunzellen wodurch eine proinflammatorische Reaktion ausgelöst wird. Die Epithelverletzung führt zur Gerinnung und Fibrinbildung, begleitet von einer Fibroblasteninvasion, um die Wunde zu verschließen. Die Fibroblasten proliferieren und werden aktiviert. Aktivierte Fibroblasten, die aufgrund der Expression von Alpha-Glattmuskel-Actin (α -SMA) als Myofibroblasten bezeichnet werden, erzeugen und deponieren übermäßige ECM-Proteine im Interstitium. Bei einer gesunden Reaktion würden die Myofibroblasten anschließend in Apoptose übergehen, um von Makrophagen entfernt zu werden, was die Reepithelisierung und die Rückkehr zum ursprünglichen gesunden Zustand

erleichtert. Durch eine Dysregulation in den o.g. Prozessen werden die Myofibroblasten bei der Lungenfibrose seneszent (Waters et al. 2018) und erzeugen weiterhin steifes Gewebe. Diese Lungenversteifung geht mit einem irreversiblen Alveolarkollaps einher, der die Atmung bei Patienten massiv erschwert bis hin zum Lungenversagen (Selman et al. 2001). Sowohl die Bildung von Narbengewebe als auch die Entwicklung einer Fibrose sind durch Gewebekontraktion gekennzeichnet. Das Verständnis der Mechanobiologie von Fibroblasten in der ECM und die zugrundeliegenden Signalmechanismen sind für die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten für fibrotische Erkrankungen ein wichtiger Bestandteil.

2.3 Kollagen als wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix bei der Fibrosierung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist eine wichtige Komponente in der zellulären Umgebung und für deren Anpassung an die zelluläre Umgebung notwendig. Sie bildet das Gerüst für alle Zellen und Gewebe des Körpers (Rhee 2009). Das durch Fibroblasten produzierte Kollagen ist Hauptbestandteil der ECM und spielt bei der Wundheilung, sowie fibrotischen Prozessen eine wichtige Rolle. Kollagen-Typ-1 wird für den Kollagen-Gel-Kontraktions-Assay (=CGC, siehe unten) eingesetzt. Kollagen-Typ-1 kommt v.a. in Knochen und Sehnen vor. Es ist ein fibrilläres Molekül aus 3 tripelhelikalen Peptidketten, die durch Quervernetzung und kovalente Bindungen zu einem Molekül zusammengelagert sind. Die einzelnen Peptidketten bestehen aus den Aminosäuren $[\text{Gly-X-Y}]_n$ – also aus Glycin (Gly), einer variablen Aminosäure (X) und Hydroxyprolin, bzw. Prolin (Y) als Primärstruktur (=Alphaketten). Variable Aminosäuren sind meist Arginin, Lysin, Glutaminsäure und Alanin. Die Sekundärstruktur entsteht durch Wasserstoffbrückenbindungen. Über intramolekulare kovalente Bindungen kommt es zur Ausbildung einer Tertiär- und letztlich zu einer Quartärstruktur. Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau eines Kollagenmoleküls. Durch Denaturierungsprozesse (Hitze, pH-Wert-Veränderungen, mechanische Einflüsse, organische Lösungsmittel) kann die Tertiär- und Quartärstruktur wieder aufgelöst werden, wodurch es zum mechanischen Funktionsverlust des Kollagens kommen kann. Diese Eigenschaft wird bei der Präparation des Kollagens für den CGC ausgenutzt.

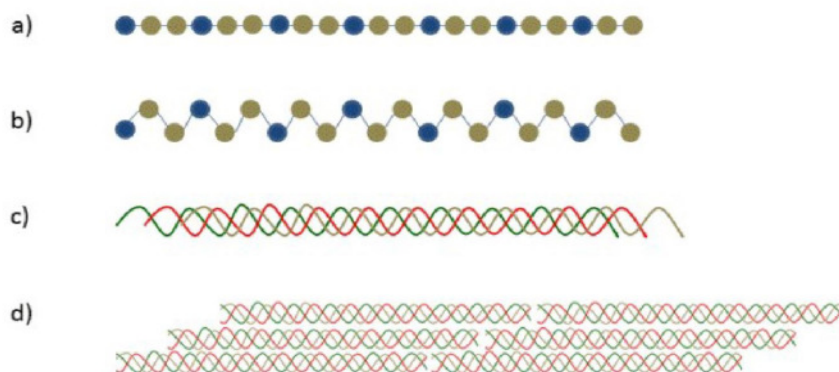


Abbildung 1: Aufbau Kollagenmolekül, a: Primärstruktur, b: Sekundärstruktur, c: Tertiärstruktur, d: Quartärstruktur (Gelatine – Eigenschaften, Herstellung und molekulare Struktur 2020.000Z).

2.4 Kollagenkontraktions-Assay als in vitro-Modell der Lungenfibrose

Der Fibroblasten-induzierte **Kollagen-Gel-Kontraktions-Assay (CGC)** wurde 1979 von Bell et al. zur Untersuchung von Fibroblasten-Matrix-Wechselwirkungen (Bell et al., 1979) eingeführt, in den letzten vier Jahrzehnten modifiziert und ist seither weit verbreitet. Fibroblasten werden dabei in eine dreidimensionale (3D) Gelmatrix bestehend aus Kollagen (oder Fibrin) auf dem Boden einer Wellplatte eingebettet, die dann manuell von der Oberfläche der Wellplatte getrennt wird (z.B. durch Abkratzen des Gelrandes von der Wellplatte mittels einer Pipettenspitze oder Spatels). Durch das Lösen der Gelmatrix von den Wänden der Wellplatte findet eine Kontraktion statt (Dallon und Ehrlich 2008; Mikami et al. 2016). Die durch Fibroblasten erzeugten Kontraktionskräfte breiten sich in der gesamten Kollagenmatrix aus und ordnen Kollagenfasern mit verringertem Matrixvolumen zu einer Struktur höherer Dichte an (Jonas und Duschl 2010). Die Messung der Größenverringering der Gelmatrix-Scheibe durch Bildgebung und anschließende Analyse ist eine direkte Möglichkeit zur Beurteilung der Kontraktilität von Fibroblasten. Das hierfür benötigte Kollagen-Typ-1 kann u.a. aus Rattenschwanzsehnen gewonnen werden. Etwa 90% des Kollagens in Rattenschwanzsehnen bestehen aus Kollagen-Typ-1, während der Rest zu 10% aus unlöslichen Bestandteilen wie elastischen Fasern und Proteoglykanen besteht (Eckes et al. 1995, S. 249). Die ersten Untersuchungen mit Kollagenpräparationen gehen auf Zachariades um 1900 zurück (Robert L. Ehrmann 1956) bei denen Kollagen mit Hilfe von Säure aufgelöst werden konnte. Ca. 50 Jahre nach Zachariades wurde die Methode der Kollagenpräparation von Ehrmann and

Gey, sowie Bornstein weiter etabliert (Robert L. Ehrmann 1956; García-Gareta 2014). Somit wird Kollagen z.B. aus den Sehnen der Rattenschwänze mit Hilfe von 0,1%-iger Essigsäure (HAc) aufgelöst. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation entfernt. Verwendet wurden Fibroblasten aus der Rattenlunge, die letztlich für die Fibrosierung im Lungentransplantationsmodell in der Ratte die Hauptagitatoren darstellen (Suesskind-Schwendi et al. 2016; Suesskind-Schwendi et al. 2012).

2.5 Therapiemöglichkeiten der Bronchiolitis obliterans/ Lungenfibrose

Bislang erfolgt die Behandlung der BO immunmodulatorisch mit Steroiden, Ciclosporin oder Tacrolimus. Aktuell gibt es allerdings keine spezifische Therapie die das Langzeit-Outcome betroffener Patienten verlängert (Au et al. 2011). Antifibrotische Wirkstoffe, wie z.B. Tyrosinkinaseinhibitoren (= RTK-I), stehen daher im Fokus der Forschung. Durch die Blockade von tyrosinkinaseabhängigen Signalkaskaden wird die Proliferation des Gewebes unterbrochen. Bislang werden diese Medikamente erfolgreich zur Behandlung der akuten- bzw. chronisch lymphatischen Leukämie, sowie bei gastrointestinalen Stomatumoren eingesetzt. Im CGC als in vitro-Modell, sollen die RTK-I Imatinib, Nilotinib und Dasatanib auf ihre antiproliferative Wirkung untersucht werden.

Imatinib war in dieser Substanzklasse eines der ersten Medikamente auf dem Markt. Mit einer Halbwertszeit von 18h ist eine Einmalgabe ausreichend. Bei guter Verträglichkeit wird zur Behandlung eine Dosierung von 400mg 1x tgl. eingesetzt. Die mittlere Bioverfügbarkeit beträgt 98%, die Plasmaproteinbindung in vitro bei ca. 95%. Die Elimination erfolgt innerhalb von 7 Tagen zu 80% über die Fäces oder den Urin (Fachinformation Imatinib).

Dasatanib spielt aktuell vor allem bei einer Imatinib-Unverträglichkeit oder Imatinib-Resistenz eine wichtige Rolle. Es wird 1x täglich in einer Dosierung zwischen 40-140mg verabreicht und hat eine mittlere Halbwertszeit von 5-6h mit einer Plasmaproteinbindung von 96%. Die Ausscheidung erfolgt nach 10 Tagen zu 85% renal oder enteral (Fachinformation Dasatanib).

Auch **Nilotinib** wird in der Therapie der CML bei Therapieversagen unter Imatinib eingesetzt. Die Dosierung beträgt 300-400mg 2x tgl. beim Erwachsenen. Die Bioverfügbarkeit beträgt 50% bei einer Plasmaproteinbindung von 98%. Nilotinib wird im Organismus oxydiert oder hydroxyliert und über Cyp3A4 metabolisiert. Die Ausscheidung erfolgt zu 90% nach 7 Tagen über den Stuhl (Fachinformation Nilotinib). In Vitro hat Dasatanib eine 325-fache-, Nilotinib

eine 20-fach höhere Rezeptoraffinität als Imatinib, weshalb insbesondere Dasatanib eine gezieltere Blockade erlaubt (Hochhaus 2007, S. 3258).

2.6 Zielstellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, einen **Kollagen-Kontraktions-Assay (CGC)** als in-vitro-Modell für die Untersuchung der antifibrotischen Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren (RTK-I; als mögliche Einsatzmedikamente bei Bronchiolitis obliterans) zu etablieren. Anschließend wurde die dosisabhängige Wirkung der RTK-I Imatinib, Dasatanib und Nilotinib auf die Kontraktionskraft von Rattenlungenfibroblasten untersucht. Zunächst wurde die Präparation von Kollagen aus Rattenschwanzsehnen nach der Methode von Bell et al etabliert und optimiert (Bell et al. 1979). Dazu wurden standardmäßige Proteinassays auf ihre Anwendbarkeit bei Kollagen untersucht (z.B. BCA-Test zur Konzentrationsbestimmung, SDS-PAGE zur Reinheitsüberprüfung). Zusätzlich wurden Einflussfaktoren des CGC-Assays überprüft (z.B. Rohkollagen/aufgereinigtes Kollagen, Zellzahl, Kollagenkonzentration, etc.).

3 Material und Methoden

Zur Einsicht der Geräte und Materialien siehe Anhang.

3.1 Zellkultur

Für die vorliegenden Versuche wurden aufgetaute Lungenfibroblasten aus Ratten verwendet. Die Zellen stammten ursprünglich aus Präparationen von unserer Lungentransplantationsstudie, bei denen die Zellen aus Segmenten von rechten Lungen von WKY-Ratten extrahiert und vermehrt wurden. Die Zellen lagen in kryokonservierter Form in einem Einfriermedium bestehend aus Kulturmedium mit 10% FKS (fötalem Kälberserum), Hepes-Puffer und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) vor. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank Laminair Heraeus ® durchgeführt. Alle Lösungen und Medien sowie Gerätschaften waren steril.

3.1.1 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Das Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen wurde in einem Wasserbad bei ca. 37°C kurz aufgetaut (bis sich alle Kristalle aufgelöst hatten) und anschließend in eine T25 Zellkulturflasche, in der 5ml Kulturmedium vorgelegt wurden, überführt. Die Zellen wurden

im Brutschrank (9% CO₂, 37°C, hohe Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 4h. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Bei Erreichen der Konfluenz (die Zellen lagen in einem geschlossenen Zellrasen – Monolayer - auf der Kulturoberfläche vor) wurden die Zellen abgelöst (3.1.2), in eine neue Zellkulturflasche überführt und zur Vermehrung weiter kultiviert.

3.1.2 Passagieren von Fibroblasten

Das Ablösen der adhärennten Fibroblasten erfolgte mittels Proteaseverdau. Durch Zugabe von Trypsin-EDTA verlieren die Zellen ihren Zell-Zell Kontakt. Sie lösen sich vom Boden und kugeln sich ab. Nach kurzer Inkubation im Brutschrank (3-5min) wurde die Proteaseaktivität mit 10% FKS-haltigem Medium abgestoppt (FKS beinhaltet Proteaseinhibitoren). Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

1. Medium absaugen
2. Zellen in der Kulturflasche mit vorgewärmtem PBS vorsichtig waschen, anschließend den Überstand mit Vakuum absaugen
3. Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden ablösen (Volumen Trypsin: T25 = 3ml, T75 = 6ml, T175 = 12ml)
4. Inkubation für 3-5min. im Brutschrank, mikroskopische Kontrolle (Abkugeln der Zellen)
5. Trypsinreaktion mit Kulturmedium abstoppen (Volumen Kulturmedium: T25 = 6ml, T75 = 12 ml, T175 = 24ml)
6. Zellsuspension in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführen
7. Zentrifugieren für 5min. bei 1200rpm und Raumtemperatur
8. Überstand über dem Zellpelett absaugen
9. Zellpelett in 1-3ml Kulturmedium resuspendieren
10. Zellzahlbestimmung im Casy ® Cell Counter and Analyser System
11. Weiterkultivieren der Zellen: 15ml Kulturmedium in einer T75-Kulturflasche vorlegen
12. Gewünschte Zellzahl zugeben, kurz schwenken
13. Erneute Inkubation im Brutschrank bis zur gewünschten Konfluenz
14. Weiterverarbeitung

3.1.3 Reduktion des Zellstoffwechsels – Serumfreie Behandlung

Um die Wirkung von Proliferationshemmstoffen zu untersuchen, wurde den Kulturen bei einer Konfluenz von 80-90% serumfreies Medium zugesetzt. Serumentzug führt zu einer Stagnation

des Zellstoffwechsels. Nach 4h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen entsprechend dem o.g. Ablauf abgelöst und die Zellsuspension für den CGC vorbereitet. Dabei wurde strikt auf den Einsatz von FKS verzichtet, um die Zellen nicht wieder zu aktivieren. Zur Vitalitätskontrolle wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet: Tote Zellen durch FKS-Entzug wären als abgekugelte Zellen zu sehen gewesen, was nach 4h nur zu einem geringen Ausmaß sichtbar war.

Berechnung der Zellzahl für den CGC:

Entsprechend den Angaben aus Tabelle 7 benötigt man für einen Ansatz (= ein 24-well) $4,5 \times 10^5$ Zellen in 500µl Kollagengel. Für einen Doppelansatz müssen in 200µl Zellsuspension $4,5 \times 10^5 \times 1200\mu\text{l}/500\mu\text{l} = 1,08 \times 10^6$ Zellen eingesetzt werden. Die 200µl stammen aus einer Zellsuspension mit $1,08 \times 10^6$ Zellen $\times 5 = 5,4 \times 10^6$ Zellen/ml. Je nach Anzahl der Ansätze muss die entsprechende Zellmenge vorab hergestellt werden.

Für 1ml Zellsuspension (ausreichend für einen 10-fach-Ansatz):

Die benötigte Zellzahl für 1ml Zellsuspension ergibt sich aus nachfolgender Berechnung:

$4,5 \times 10^5$ (Zielkonzentration pro Well) $\times 2$ (für 1ml) $\times 6$ (Verdünnungsfaktor durch Gelherstellung)

= X /ml

Zusätzlich sollte ein Reservevolumen einkalkuliert werden: hier für 8 well = 800µl + 50µl (Reservevolumen).

Ziel-Zellzahl = X/ml :1000 \times 850µl

Aus Zellkultur: Ziel-Zellzahl/Zellzahl-Casymessung = Zellmenge in ml

Die benötigte Zellzahl wurde entnommen und in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Dieses wurde erneut bei 1200rpm für 5min. zentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Zellpelett in das benötigte Volumen Kulturmedium aufgenommen (hier: 850µl).

3.1.4 Zellzahlbestimmung mittels CASY

Die Konzentration der Zellen aus den Kulturen wurde in der Suspension mittels Zellzählung bestimmt, der CASY Messung. Die **Funktionsweise** der CASY-Messung (Abbildung 2) basiert auf der elektrischen Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore. Zellen mit intakter Zellmembran schließen den elektrischen Strom aus und generieren ein Signal, das vom Volumen der Zelle abhängt (Electrical Current Exclusion, ECE®). Tote Zellen mit einer geschädigten Zellmembran können den Strom nicht mehr ausschließen und werden mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst. Die eigens für die CASY®-Technology entwickelte

„Pulsflächenanalyse“ ist eine digitale Signalauswertung mit einer Million Messpunkten pro Sekunde. Die hohe Auflösung stellt sicher, dass vitale Zellen von toten Zellen getrennt erfasst werden und somit das CASY® einen sehr großen Messbereich abdeckt. Damit werden alle Objekte von Zelldebris über tote und vitale Zellen bis hin zu großen Zellclustern mit einer einzigen Messung simultan erfasst (entnommen aus Usermanual).

Vorgehen: Ein Casy-Messgefäß® wird mit 5ml CASYton® gefüllt. Nun gibt man 20µL der Zellsuspension hinzu und mischt vorsichtig. Anschließend stellt man das Messgefäß unter die Messkapillare. Im Programm wird das Messprotokoll laden. Es werden automatisch 3 Messungen (à 400µl Probenvolumen) hintereinander durchgeführt. Nach abgeschlossener Messung wird der untere- und obere Cut-off Wert festgelegt. Die Zellzahl/ml, sowie Volumen und Durchmesser der Zellen können abgelesen werden. Bei zu hoher Zellzahl muss der Vorgang mit einer verdünnten Probe wiederholt werden. Danach werden die Ergebnisse gespeichert.

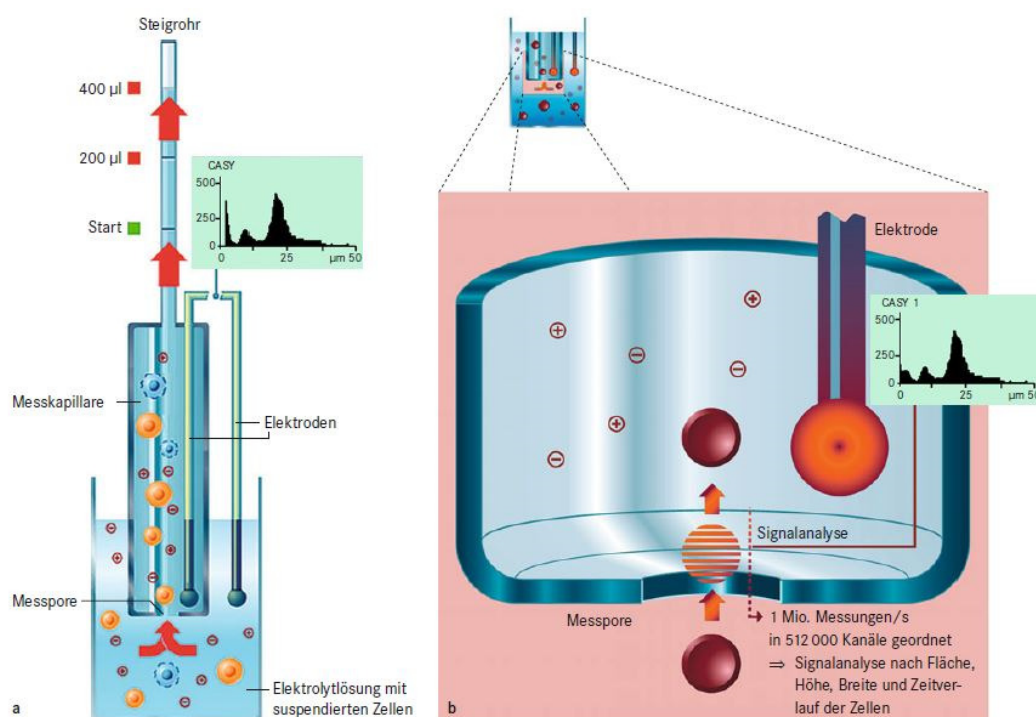


Abbildung 2: Messprinzip der elektronischen Messungen mit CASY (Incelligence).

3.2 Kollagenherstellung

3.2.1 Kollagenpräparation

Die Kollagenherstellung erfolgte in Anlehnung an Bell et al. 1979. Für die Kollagen - Typ 1 - Präparation wurden Rattenschwänze von toten Spendertieren (aus Lungentransplantationsstudie) eingefroren. Zum Auftauen wurden 3 tiefgefrorene

Rattenschwänze für ca. 20min. in 100% Ethanol eingelegt. Anschließend erfolgte die Hautentfernung über eine Längsinzision mit einem Skalpell und stumpfem Abpräparieren mit einer Präparierschere. Um die Sehnenentfernung zu erleichtern, wurde der Rattenschwanz in 3-4 kleine Stücke zerteilt. Mit einer chirurgischen Pinzette wurden die einzelnen Sehnen aus der Sehnenscheide herausgezogen, 2x hintereinander für je 10 min. in sterilem PBS gewaschen und anschließend jeweils für 10min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 75%, 95%, 100% Ethanol) entwässert und desinfiziert. In einer zuvor gewogenen Petrischale wurde das Sehnenmaterial getrocknet und über eine Analysenwaage das Trockengewicht bestimmt. Abbildung 3 dokumentiert die wichtigsten Stationen der Kollagenpräparation.

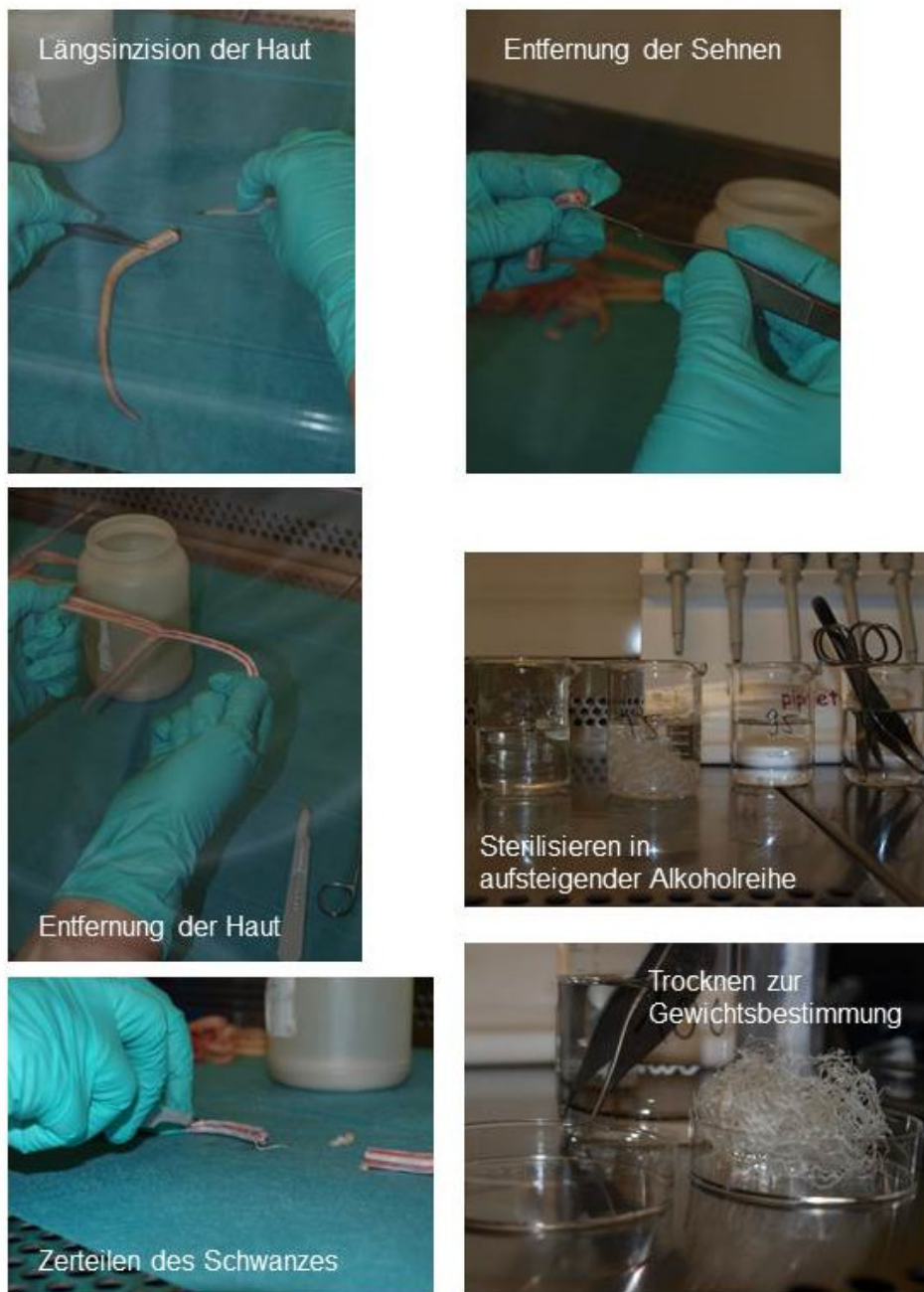


Abbildung 3: Fotodokumentation über die Sehnenpräparation.

Für die anschließende Säureextraktion wurden in einem sterilen Becherglas 0,5g Sehne in 150ml 0,1% HAc aufgenommen, das Becherglas mit Alufolie verschlossen und für 48h bei 4°C mit einem Magnetrührer gerührt. Nach Auflösen der Sehnenfäden wurde die Lösung in sterile Zentrifugengefäße gegeben und für 2h bei 4°C und 14500rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren befanden sich im Pellet unlösliche Bestandteile und im Überstand gelöstes „Rohkollagen“. Analog zu Bell et al. 1979, wurde dieses dann durch wiederholtes Neutralisieren in NaOH und anschließendem Ansäuern mit 0,1%-HAc „aufgereinigt“ (Abbildung 4). Das Prozedere wurde 3x wiederholt (Bezeichnung in Ergebnissen: 1xNaOH, 2xNaOH, 3xNaOH). Die finale Lösung wurde portioniert eingefroren.

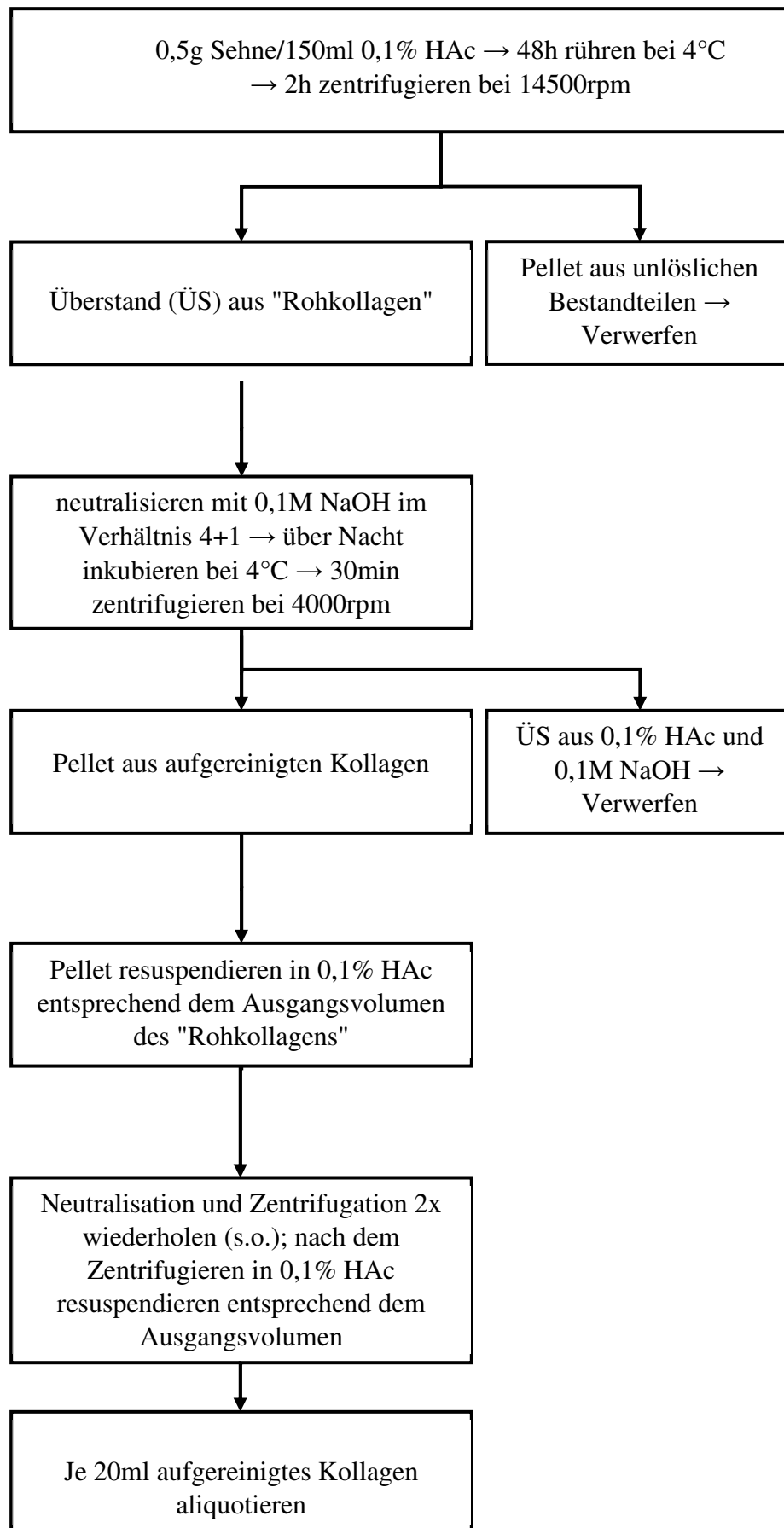


Abbildung 4: vollständiges Schema zur Präparation von Kollagen.

Das „Aufreinigen“ der Kollagenpräparation war sehr Zeit-, Personal- und Materialaufwändig. Zudem konnten die Kollagenpellets nach dem Ausfällen nur unzureichend in HAc gelöst werden (siehe 5.1). Dies erschwerte die Konzentrationsbestimmung. Dagegen lag das „Rohkollagen“ immer als homogene Lösung vor. Ein Großteil der Versuche wurde mit Rohkollagen durchgeführt. Das Rohkollagen wurde ebenfalls in 20ml-Portionen bei -20°C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert. Zur Herstellung des Rohkollagens siehe Abbildung 5.

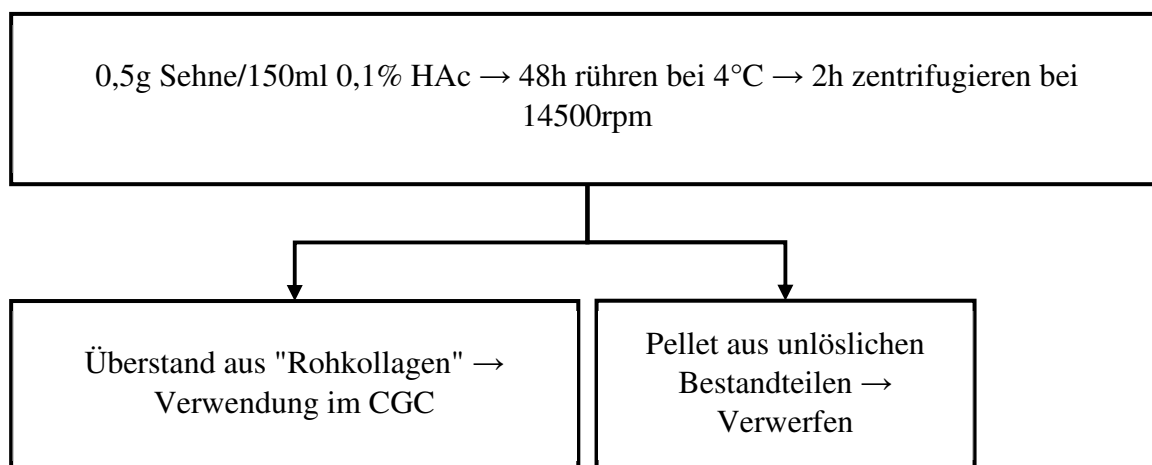


Abbildung 5: Protokoll zur Herstellung von Rohkollagen.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung vom Rohkollagen

Für die Kontraktionsversuche war es notwendig, eine möglichst genaue Konzentrationsangabe für Kollagen zu erhalten. In der Literatur gibt es verschiedene Möglichkeiten, um die Konzentration des Kollagens zu bestimmen:

1. Lyophilisieren und die Trockenmasse bestimmen
2. BCA-Test (LOWRY et al. 1951)
3. SDS-Page und Coomassie-Färbung

3.2.2.1 Lyophilisieren und Trockenmasse bestimmen

Beim Lyophilisieren bzw. Gefriertrocknen handelt es sich um eine schonende Methode, um Proteine zu konzentrieren. Verwendet wurde ein SpeedVac Christ ® Alpha RVC. Dieser Rotations-Vakuum-Konzentrator dient der schonenden Trocknung aus flüssigen Produkten. Dabei wird unter Einsatz von Vakuum erreicht, dass die Probe vom flüssigen - direkt in den festen Aggregatzustand übergeht. Die einzelnen Proben (mit i. d. R. 1ml Volumen) wurden zunächst lyophilisiert und das Gewicht des eingetrockneten Lyophilisats bestimmt. Dazu

wurden die Proben in austarierte 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und in der SpeedVac Christ® Alpha RVC unter Vakuum für ca. 8h lyophilisiert. Anschließend wurden die Gefäße mit dem Lyophilisat erneut gewogen und die Tara abgezogen. Damit war es möglich die Proteinmenge pro ml Volumen anzugeben. Das Lyophilisat wurde für die BCA-Testung, als auch für die Reinheitstestung mittels SDS-Page verwendet.

3.2.2.2 BCA-Test

Testprinzip:

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über einen BCA-Test (BCA, Bicinchoninsäure) nach Lowry et al 1951. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Peptidbindungen zu einwertigen Kupferionen. Diese geben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch ausgewertet werden kann (Holtzhauer 2006). Die genaue Beschreibung des Testes siehe: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225> (07.12.2017).

Zur Erstellung der Standardkurve wurde gekauftes Kollagen (ibidi cell focus, 5mg/ml) mit bekannter Konzentration verwendet. Ein Aliquot mit 1ml des gekauften Kollagens wurde lyophilisiert (3.2.2.1) und in 500µl 2% SDS aufgenommen damit eine Ausgangskonzentration von 2,5mg/ml (Stammlösung) erreicht wurde. Diese Stammlösung wurde anschließend mit 2%iger SDS-Lösung verdünnt (Standardkurve, 4.2.2). Zum Vergleich des präparierten Kollagens wurde aus dem vorliegenden Protokoll der Kollagenpräparation (Abbildung 4) vom Rohkollagen 3 Proben à 1ml Volumen entnommen. Alle Proben lagen zum Zeitpunkt der Probenentnahme in 0,1% HAc gelöst vor. Zur Vorbereitung für den BCA-Test wurden zunächst die Proben ebenfalls lyophilisiert.

Durchführung des BCA-Testes: Für die Probenvorbereitung (und dem anschließenden SDS-Page) war vorab eine Konzentrationsbestimmung notwendig. Dazu wurde ein Lyophilisat (mit bekanntem Gewicht, aus 1ml Volumen) in 300µl 2% SDS aufgenommen. 10, 5 oder 2,5µl dieser Probe wurden mit jeweils 200µl BCA-Reagenz/CuSO₄ verdünnt (in 96-well-Mikrotierplatten), 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend die Absorption bei 540nm im Photometer gemessen. Eine gleichzeitig aufgenommene Standardkurve (4.2.2) diente als Referenz. Nach Abzug des Absorptionswertes des Lösungsmittels (Hintergrund) wurden die so bestimmten Absorptionen (SoftMax-Programm) unter Berücksichtigung der Verdünnung in die entsprechenden Konzentrationen umgerechnet.

3.2.2.3 SDS-PAGE

SDS-Page steht für engl. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Beim SDS-Page handelt es sich um eine biochemische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach Molekülgröße im elektrischen Feld. Durch Zugabe von 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) werden alle positiven Ladungen eines Proteins maskiert. Als Trennmedium wird ein Gel auf Polyacrylamidbasis verwendet. Um die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins aufzubrechen, wird nach Zugabe von 2% SDS das Gemisch bei 95°C gekocht. Zur Reduktion von Disulfidbrücken ist zusätzlich die Gabe von β -Mercaptoethanol notwendig. Nach der Probenvorbereitung werden die Proben auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Über die Anlage eines elektrischen Felds wandern die Moleküle des Proteins zur Anode (positiver Pol). Je nach Größe bleiben die Moleküle auf ihrem Weg zur Anode im Gel hängen. Dabei wirkt das Gel wie ein Sieb. Kleinste Moleküle können am weitesten wandern. Am Ende entstehen einzelne Banden, die für weitere analytische Verfahren entsprechend sichtbar gemacht werden. Zur weiteren Aufarbeitung der Banden wurde eine Coomassie-Färbung verwendet. Dabei werden die aufgetrennten Proteine im Gel zunächst fixiert und das Gel anschließend in eine Coomassie-Färbelösung eingelegt. Da die Färbelösung das ganze Gel färbt, ist am Schluss eine Entfärbung notwendig. Die Bandenintensität wurde densitometrisch ausgewertet und sollte Aussagen zur Konzentration und Reinheit des präparierten Kollagens geben (SDS-Page). Zur Herstellung der Standardkurve wurden die Proben nach dem Lyophilisieren zunächst in 2% SDS aufgenommen. Für die Verdünnungsreihe wurde eine 4:1 Verdünnung hergestellt (siehe Probenvorbereitung). Unser eigens hergestelltes Kollagen hatte nach dem Lyophilisieren ein Gewicht von 2,3mg/ml. Da es im Vergleich zu gekauften Kollagen (Konzentration 2,5mg/ml) nur geringe Unterschiede in der Standardkurve gab, konnten wir die Standardkurve unseres Kollagens als internen Standard zur Konzentrationsbestimmung verwenden. Für die Durchführung werden verschiedene Lösungen benötigt, die zunächst hergestellt werden mussten: Der **4-fach Lämmli-puffer** wird zur Probenvorbereitung verwendet (siehe unten). Zur Zusammensetzung siehe Tabelle 1. Der Zusatz von Bromphenolblau dient als Farbmarker, um die Laufstecke (Geschwindigkeit, Richtung, Präzision) aber auch um den aktuellen Stand der Proteine zu beobachten. Man könnte hierbei die Laufgeschwindigkeit durch Veränderung z.B. der Stromstärke verändern. Außerdem ist die Beobachtung der Laufbanden über den Farbmarker enorm wichtig, um die Dauer des Laufes beenden zu können.

1M Tris pH 6,8 (Sammelgelpuffer)	2,4ml
SDS	0,8g

Glycerol (100%)	4ml
Bromphenolblau	0,001 - 0,002g
a.d.	2,8ml
Volumen	10ml

Tabelle 1: Zusammensetzung Lämmli-puffer.

Mit der **Fixierlösung** werden die Proteine nach dem Elektrophoreselauf im Gel zu fixiert.

50% MeOH	125ml
10% Eisessig	25ml
40% H ₂ O	100ml

Tabelle 2: Zusammensetzung der Fixierlösung.

Mit der **Färbelösung** wird das Gel über Nacht eingefärbt. Dabei bindet der Farbstoff (Brilliantblau) an die basischen Seitenketten der Aminosäuren im Kollagenmolekül.

40% MeOH	100ml
10% Eisessig	25ml
50% H ₂ O	125ml
Färbetabletten (Brilliantblau))	4

Tabelle 3: Zusammensetzung der Färbelösung.

Mit der **Entfärbelösung** sollen ausschließlich die gefärbten Banden densitometrisch erfasst werden.

30% Methanol	75ml
10% Eisessig	25ml
60% H ₂ O	150ml

Tabelle 4: Zusammensetzung der Entfärbelösung.

Probenvorbereitung:

1. 1ml Probe lyophilisieren
2. Lyophilisat in 1ml 2%SDS aufnehmen (Probe)
3. 60µl Probe + 20µl 4-fach Lämmli-Puffer + 2µl β-Mercaptoethanol (Zusammensetzung siehe Anhang)
4. Kochen bei 95°C für 5min., anschließend sofort die Probe auf Eis stellen
5. 10µl der Probe pro Tasche aufgetragen.

Gele gießen:

Die Gelflüssigkeiten wurden nach den Angaben aus den Tabelle 1 und Tabelle 2 zusammengemischt (TEMED und APS wurden erst kurz vor dem Gießen zugegeben). Zunächst wurde das Trenngel, dann das Sammelgel darüber gegossen.

Trenngel		
Anzahl der Gele	2	4
Konzentration Acrylamid (%)	10	10
Volumen gesamt (ml)	10	25
H ₂ O (ml)	4,0	8,0
1,5M Tris-HCl 8,8 (ml) (Resolving Buffer)	2,5	5,0
Acryl-/Bisacrylamid 30% (ml)	3,4	6,8
SDS, 10%ig (ml)	0,1	0,2
TEMED (ml)	0,01	0,02
APS, 10%ig (ml)	0,1	0,2

Tabelle 5: Pipettierschema Trenngel.

Sammelgel			
Anzahl der Gele	1	2	4
H ₂ O (ml)	1,2	2,4	4,8
1,5M Tris-HCl 6,8 (ml) (Stacking Buffer)	0,5	1,0	2,0
Acryl-/Bisacrylamid 30% (ml)	0,26	0,52	1,04
SDS, 10%ig (ml)	0,02	0,04	0,08
TEMED (ml)	0,002	0,005	0,01
APS, 10%ig (ml)	0,01	0,05	0,1

Tabelle 6: Pipettierschema Sammelgel.

Für die Gelelektrophorese wird nach Einfüllen der Proben in die Taschen des Sammelgels eine Spannung von 20mA angelegt. Die Proben laufen zunächst durch das Sammelgel. Sobald sie die Trennlinie zum Trenngel erreicht haben, wird die Spannung auf 30mA erhöht, bis die Proben durchgelaufen sind. Bromphenolblau läuft den Proben voraus und gibt die Laufzeit vor. Als Laufpuffer wurde TGS (Biorad, 10x TGS, 161-0772) verwendet. Nach der Elektrophorese erfolgt das Färben des Gels. Alle Schritte erfolgen auf dem Schüttler unter dem Abzug (außer 50°C-Färbung).

1. Gel direkt nach dem Elektrophoreselauf 1-2h bei Raumtemperatur mit der Fixierlösung fixieren
2. Über Nacht in der Färbelösung färben
3. 1-4h bei Raumtemperatur entfärben (evtl. 1x Entfärbelösung erneuern), beobachten, dass nicht alles wieder entfärbt
4. Zur Lagerung in demineralisiertem Wasser (=VE-Wasser) bis zur Auswertung aufbewahren. Trockene Gele können rehydriert werden.

Anmerkung: Fixierungslösung und Färbelösung können wiederholt eingesetzt werden. Die erste Entfärbelösung sollte entsorgt werden.

Für die Erstellung der Standardkurve wurden die Proben wie oben beschrieben vorbereitet. Durch das lyophilisieren war die Konzentration unserer Proben bereits bekannt. Zum Vergleich verwendeten wir gekauftes Kollagen. 600µl Probe mit bekannter Konzentration wurde nun in 200µl 2%SDS aufgenommen. Diese Probe wurde dann weiter jeweils im Verhältnis 4:1 verdünnt. Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Proben reduziert, in dem zu 60µl der Probe 20µl 4-fach Lämmli und 2µl B-Mercaptoethanol zugegeben wurden. Als nächstes wurden jeweils 10µl der Probe in die Taschen des Sammelgels pipettiert und die Elektrophorese wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 4.2.3).

Zur Auswertung wurden die Gele mittels ChemiDoc™ von Biorad colorimetrisch fotografiert. Anschließend wurden die Bilder der gefärbten Gele mit der Software Imagelab ausgewertet. Über die dargestellten Banden erhält man so eine Aussage über die Konzentration der einzelnen Banden in Bezug auf die gesamte Lane und somit auch zur eingesetzten Proteinmenge.

3.3 Kollagen-Kontraktionsassay

3.3.1 Gelherstellung

Ursprünglich sollte ein käuflich verfügbares Kollagen (ibidi cell focus) und das zugehörige Protokoll für den **Kollagen-Kontraktionsassay (CGC)** eingesetzt werden. Da die Herstellung von Kollagen aus Rattenschwanzsehnen in vielen Publikationen (Liu et al. 2001; Elsdale und Bard 1972; Bell et al. 1979) beschrieben wurde und im Labor der HTC ausreichend Rattenschwänze verfügbar waren, wurde das Kollagen eigens hergestellt und für den CGC verwendet. Die Kollagenpräparation ist in 3.2.1 beschrieben. Die Herstellung des Kollagengels erfolgte nach den Angaben von ibidi cell focus. Tabelle 7 stellt die notwendigen Lösungen und Mengen für 2 Ansätze (zwei 24-wells) gegenüber.

Substanz	Menge (μ l)
DMEM (10x konzentriert)	80
NaOH (1M)	20
ddH ₂ O	88
NaHCO ₃ (7,5%)	12
DMEM (1x konzentriert)	200
Kollagen (2mg/ml)	600
Zellsuspension ($5,4 \times 10^6$ Zellen/ml)	200
Gesamt	1200

Tabelle 7: Pipettierschema CGC (Herstellerprotokoll ibidi cell focus).

Für die Zellsuspension wurde eine konfluente Fibroblastenkultur, die zunächst für 4h serumfrei gesetzt wurde, abgelöst und die Suspension i. d. R. mit einer Konzentration von $5,4 \times 10^6$ Zellen/ml angesetzt (Berechnung siehe 3.1.3). Der CGC wurde in sterilen 24-Well-Platten mit einer Kulturfläche von $1,9\text{cm}^2$ durchgeführt. Für die Kollagenlösung wurde i.d.R. mit einer Kollagenkonzentration von 1mg/ml gearbeitet. Die Substanzen wurden in der angegebenen Reihenfolge (Tabelle 7) pipettiert. Zur Herkunft der verschiedenen Substanzen siehe Anhang. Durch Zugabe von Kollagen wurde die Suspension gelartig und lies sich nach etwa 5min. nicht mehr gut pipettieren. Ein zügiges Arbeiten für eine homogene Suspension, sowie ein kurzes sanftes Vortexen vor und nach Zugabe der Zellsuspension war also nötig. Nachdem die Suspension in das 24-well pipettiert wurde, erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 15-30min. im Brutschrank. Während dieser Zeit wurde die Suspension zu einem festen Gel. Zum Schluss wurde das Gel mit $500\mu\text{l}$ Kulturmedium überschichtet. Der Überstand enthielt Kulturmedium mit 10% FKS +/- den unterschiedlichen Konzentrationen der RTK-Inhibitoren (siehe Tabelle 9). Um eine Kontraktionsreaktion zu ermöglichen, wurde der Rand mit einer Pipettenspitze vorsichtig gelöst. Die Inkubation erfolgte für weitere 24h im Brutschrank. Anschließend wurde das Ergebnis mit der Kamera Olympus E-450 mit einem Objektiv-Well-Abstand von 15,5cm (Übersichtsaufnahme) bzw. 13cm (Nahaufnahme) fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ (siehe 3.5.1) sowie SigmaPlot 13.0. Berechnet wurde die Fläche der Gele in Abhängigkeit von der Ausgangsfläche des einzelnen Wells ($1,9\text{cm}^2$) in %.

3.3.2 Positiv- und Negativkontrollen

Die Etablierung einer Positiv- und Negativkontrolle wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Die Negativkontrolle sollte der Fläche eines nicht-kontrahierten Gels, also der

Kulturfläche, entsprechen; die Positivkontrolle sollte eine Kontraktion des Gels auslösen. Verschiedene Variable, insbesondere das Vorhandensein von FKS in den unterschiedlichen Kompartimenten, wurden hierfür untersucht. Schlussendlich war es wichtig für die Gelherstellung kein FKS zu verwenden (siehe 4.4.4). Um eine Kontraktion zu ermöglichen, musste jedoch FKS in den Überstand eingesetzt werden. Es wurden daher folgende Kontrollen definiert:

1. Negativkontrolle: Überstand aus 500µl DMEM (ohne FKS)
2. Positivkontrolle: Überstand aus 500µl DMEM plus 50µl FKS

3.3.3 Variation der Bedingungen für den CGC

Ein Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung des CGC. So wurden folgende Parameter variiert und auf ihre Auswirkung hinsichtlich der Kontraktion untersucht:

1. Zellzahl im Gel, siehe 4.4.2
2. Kollagenkonzentration, siehe 4.4.3
3. Einfluss aktivierter Zellen (Vorbehandlung mit FKS) bzw. nicht aktivierter Zellen (serumfreie Vorbehandlung), siehe 4.6.2
4. Unterschiedlich lange Inkubationszeiten der Gele, siehe 4.6.1

3.4 Wirkung von RTK-I auf die Kontraktionskraft von Fibroblasten

3.4.1 RTK-I im CGC

Zur Untersuchung der RTK-I im CGC wurden die Zellen vor dem Zugeben in das Kollagengel für 4h serumfrei gesetzt. Man spricht von nicht aktivierten Fibroblasten. Es wurde mit $4,5 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz in 500µl Kollagengel gearbeitet. Die Kollagenkonzentration betrug 1mg/ml. Die Inkubationszeit mit den RTK-Inhibitoren betrug immer 24h. Das Pipettierschema für den Assay ist analog zum Protokoll in Tabelle 7. Die Durchführung erfolgte in einer sterilen 24-well-Platte. Im Überstand wurde hier 500µl des jeweiligen Medikaments in der Zielkonzentration eingesetzt. Für die Positiv- und Negativkontrollen wurde in den Überstand 500µl 1xDMEM + 10% FKS (Positivkontrolle) bzw. 500µl 1xDMEM ohne FKS (Negativkontrolle) gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30min. bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurde dem Überstand jeweils 10% FKS (50µl) zugesetzt und zum Schluss die Ränder vorsichtig mit einer Pipettenspitze gelöst. Nach einer Inkubation für 24h bei 37°C im

Brutschrank wurde das Ergebnis mit der Kamera fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ, sowie Sigma Plot.

3.4.2 Herstellung von Medikamentenlösungen

Für die Medikamentenversuche wurden 3 verschiedene Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren (RTK-I) eingesetzt: Dasatanib, Imatinib, Nilotinib. Dazu wurden Stammlösungen in DMSO hergestellt. Die Einwaage der Medikamente wurde wie folgt errechnet:

$$\text{Einwaage (g)} = \text{Molmasse (g/mol)} * \text{Volumen (l)} * \text{Molarität (mol/l)}$$

Die Molmasse der RTK-I, sowie die gewünschte Molarität der Stammlösung (SL) waren bekannt. Auf der Analysenwaage wurden die RTK-I abgewogen (Pulverform) und das erforderliche Volumen an DMSO zugegeben.

RTK-I	Molmasse (g/mol)	Molarität der SL (mM)	Einwaage (mg)	DMSO (µl)
Dasatanib	488,01	10	1,8	369
Imatinib	589,71	100	1,6	27,1
Nilotinib	529,52	40	1,2	56,7

Tabelle 8: Herstellung der Stammlösung.

Folgende Endkonzentrationen der RTK-I in Kulturmedium wurden für den Versuch eingesetzt:

	Endkonzentration der RTK-I im Kulturmedium (µM)					
	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Dasatanib	10	5	2,5	1	0,5	0,1
Imatinib	100	20				
Nilotinib	40	20				

Tabelle 9: Konzentrationen der Medikamente in µM für den Versuch.

Zur Herstellung der Lösungen (L1-L6, Tabelle 10 und Tabelle 11) wurden zunächst die SL aus Tabelle 8 mit Kulturmedium verdünnt (1:1000) (ergibt dann L1). Dieser Schritt war erforderlich, da die Konzentration von DMSO im Medium nicht größer als 0,1% betragen durfte. DMSO ist ein Zellgift und würde in höheren Konzentrationen einen Zelltod auslösen.

RTK-I (Konzentration)	L1 (µM)	Volumen der SL (µl)	Volumen Kulturmedium (µl)
Dasatanib (10mM)	10	3	2997

Imatinib (100mM)	100	2	1998
Nilotinib (40 mM)	40	2	1998

Tabelle 10: Herstellung von L1.

Anschließend wurde L1 mit Kulturmedium + 0.1% DMSO weiter verdünnt.

	Endkonzentration (μM)	Volumen L1 (μl)	Volumen DMEM + 0,1% DMSO (μl)
Dasatanib, L2	5	600	600
Dasatanib, L3	2,5	300	900
Dasatanib, L4	1	200	180
Dasatanib, L5	0,5	600 (aus 1 μM)	600
Dasatanib, L6	0,1	120 (aus 1 μM)	1080
Imatinib, L2	20	300	1200
Nilotinib, L2	20	600	600

Tabelle 11: Herstellung der unterschiedlichen Verdünnungen.

3.4.3 Fluoreszenzfärbung zur Vitalitätsprüfung

Zur Überprüfung der Vitalität unter dem Einfluss der RTK-I, wurden die Zellen mit den höchsten Konzentrationen (L1) der RTK-I inkubiert und dann mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Kernfärbung) und Calcein-AM (Vitalfärbung) gefärbt. Dazu wurden Fibroblasten auf 8-Kammer-Objektträger (8000 Zellen pro Kammer) ausgesät, zwei Tage kultiviert (Monolayerbildung) und dann für 24h mit jeweils 400 μl eines RTK-I inkubiert:

1. Dasatanib: 10 μM
2. Imatinib: 100 μM
3. Nilotinib: 40 μM

Danach wurden die Wells jeweils mit 300 μl Calcein gefärbt und für 1h im Brutschrank und erneut bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 2x mit PBS gewaschen und mit 300 μl 2% Paraformaldehyd für 20min. bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem 2x Waschen mit PBS erfolgte die Gegenfärbung mit 300 μl DAPI für 1h bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde erneut 2x mit PBS gewaschen und der Objektträger eingedeckt. Als Einbettmedium wurde Fluoromount-G verwendet. Die Objektträger wurden nach dem Trocknen umgekehrt unter dem Keyence-Mikroskop (20xVergrößerung) fotografiert. Wegen der Fluoreszenz war

eine permanente dunkle Lagerung essenziell, ansonsten wären die Präparate ausgebleicht. Angaben zu Medien und Färbelösungen siehe Anhang.

3.5 Auswertung der Versuche

3.5.1 Image J

Um das Ausmaß der Kontraktion bestimmen zu können, wurde die Fläche des Gels nach 24h bestimmt. Dazu wurden die Fotos im Programm Image J hochgeladen. Als Berechnungsgrundlage diente die technische Zeichnung (siehe Abbildungsverzeichnis Abbildung 1) der verwendeten 24-well-Platte. In dieser ist der Bodendurchmesser des Wells mit 1,55cm und die Kulturfläche mit 1,9cm² angegeben. In mehreren Referenzbildern ergaben sich für 1,55cm 540pixel. Die Werte für die Pixelzahl und des Innendurchmessers wurden im Image J als Berechnungsgrundlage festgelegt. Nach dem Öffnen des Bildes, Umstellen über Image -> Type auf 32-bit, so dass das Bild als Graustufen erscheint. Über Image → adjust → window/level den Kontrast und die Helligkeit einstellen, damit sich das Gel besser abhebt. Mit einem Zeichen- und Bildbearbeitungstool wurde das Gel umrandet und mit Hilfe des festgelegten horizontalen Durchmessers die Fläche bestimmt. Jedes Well mit den dazugehörigen Einstellungen für Kontrast und Helligkeit wurde als Bildbeweis gespeichert. Zur Bildanleitung der Auswertung mit ImageJ siehe Abbildungsverzeichnis Abbildung Nr. 2-9. Zum Schluss musste die Gelfläche durch die Fläche des Wells dividiert werden, um einen prozentualen Anteil ermitteln zu können. Die Flächenangaben erfolgten stets in %. Die unterschiedliche Dicke des Gels wurde bei den Messungen nicht berücksichtigt. Weiterhin unberücksichtigt blieb eine mögliche Abweichung der Fläche in % bei nicht genau von senkrecht oben fotografierten Wells.

3.5.2 Statistische Auswertung mit Sigmaplot

Die Werte der jeweiligen Versuche wurden in Sigmaplot übertragen. Die statistische Auswertung wurde mit dem Bonferroni t-Test durchgeführt. Hierzu wurden Werte aus Doppelbestimmungen gemittelt und die zu untersuchenden Variable paarweise ausgewertet. Die Anzahl der unabhängigen Versuche mit Doppelbestimmung sowie deren Standardabweichung ist im Ergebnisteil tabellarisch dargestellt. Alle Einzeldaten zu den jeweiligen Auswertungen finden sich im Anhang. Ergebnisse mit $p < 0,05$ werden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Kollagenpräparation

4.1.1 Standardisierung des Protokolls

Damit das Protokoll (2.2.1) zur Kollagenpräparation allgemein angewendet werden konnte, mussten zunächst die Gütekriterien Objektivität, Reliabilität und Validität überprüft werden. Dazu wurde von 2 verschiedenen Personen an 3 verschiedenen Zeitpunkten Kollagen-Typ-1 präpariert. Am Ende der Präparationsreihe wurde ein CGC mit je einer 3-fach-Bestimmung durchgeführt (Abbildung 6). Für den Assay verwendeten wir jeweils $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well bei einer Rohkollagenkonzentration von 1mg/ml.

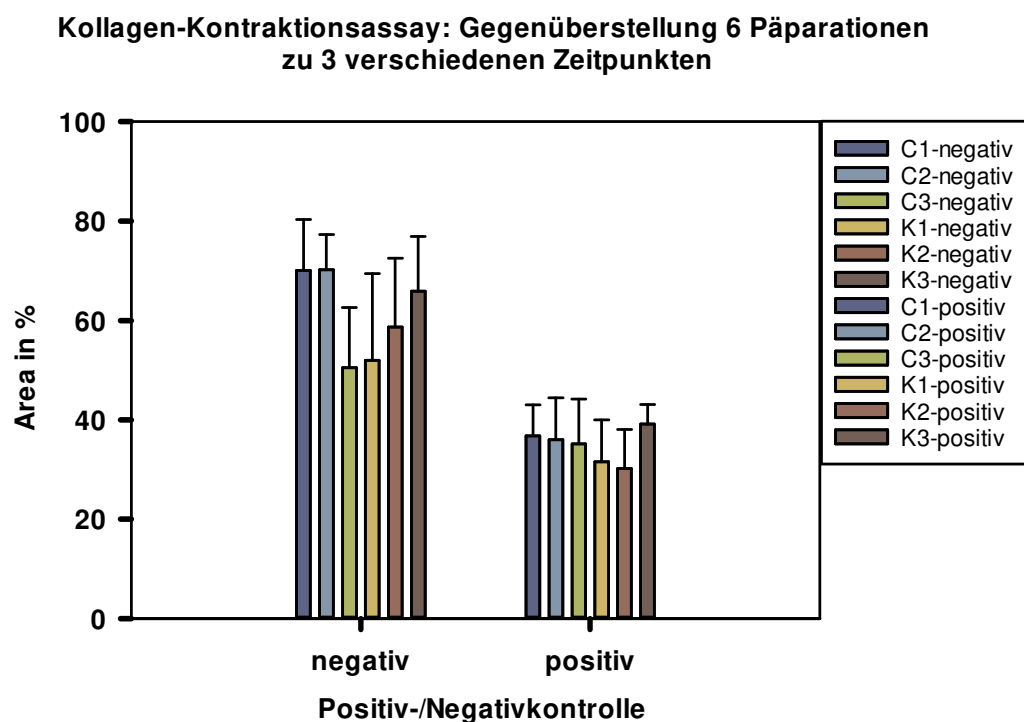


Abbildung 6: Gegenüberstellung von 2 unabhängigen Kollagen-Präparationen (C und K) an 3 verschiedenen Zeitpunkten; Verwendung von Rohkollagen (1mg/ml) mit nicht-aktivierten Zellen ($4,5 \times 10^5$ Zellen pro 24-well) in 3x-Bestimmung; Darstellung der Positiv- und Negativkontrollen (siehe Text).

Letztendlich haben wir gesehen, dass unabhängig von wem die Präparation durchgeführt wurde, die Versuche im CGC funktionieren. Die Wiederholbarkeit des Protokolls ist ebenso gegeben. Das Protokoll zur Kollagenherstellung ist somit ausreichend etabliert.

4.1.2 Bilanzierung

Tabelle 12 zeigt die Bilanz einer Präparation durch 3 Beobachter. In der Rohkollagenfraktion lagen zwischen 54 und 88 % reines Kollagen vor.

	Trocken- gewicht Sehne (mg)	Volumen HAc (ml)	End- konzentration (BCA-Test) (mg/ml)	Präparierte Proteinmenge (mg)	Ausbeute (%)
1. Beobachter	630	189	1,80	340	54
2. Beobachter	804	241	2,30	554	69
3. Beobachter	586	175,8	2,95	519	88
MW \pm SD	673 \pm 94	202 \pm 34	2,35 \pm 0,58	471 \pm 115	70 \pm 17

Tabelle 12: Ergebnisse einer Kollagenpräparation von 3 unabhängigen Beobachtern zu einem Zeitpunkt.

4.2 Konzentrationsbestimmung

Für die Kontraktionsversuche war es notwendig, eine möglichst genaue Konzentrationsangabe für Kollagen zu bekommen. In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, um die Konzentration des Kollagens zu bestimmen:

1. Lyophilisieren und die Trockenmasse bestimmen
2. BCA-Test (LOWRY et al. 1951)
3. SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

4.2.1 Lyophilisieren

Eine Rohkollagenlösung in 0,1% HAc wurde mit gleichen Volumina auf mehrere (vorher austarierte) 2ml-Eppendorfcups aufgeteilt und lyophilisiert. Das Nettogewicht wurde mit einer Analysenwaage bestimmt. Im Weiteren wurden 2 Cups mit je 1ml 0,1% HAc bzw. 2% SDS-Lösung aufgefüllt und das Lyophilisat darin aufgelöst. Anschließend wurden unterschiedliche Volumina der jeweiligen Lösung in austarierten Eppendorf-Cups abgefüllt, lyophilisiert und dann das Nettogewicht des jeweiligen Lyophilisats bestimmt.

Abbildung 7 zeigt die lineare Abhängigkeit zwischen dem vorgelegten Volumen und dem resultierenden Gewicht des jeweiligen Lyophilisats. Die Steigungen der Kurven lagen

unabhängig vom Lösungsmittel (HAc bzw. SDS) bei $2,46 \pm 0,20$ (Abbildung 7 oben). Fasst man die Nettogewichte zusammen, so ergab sich eine Steigung von 2,37 (Abbildung 7 unten). Die Steigung gibt die Konzentration der Kollagenlösung in mg/ml an. Problem bei dieser Methode war, dass die Gewichtsbestimmung des Lyophilisats mit weniger als 1mg aufgrund hoher Messungenauigkeiten mit großen Fehlern behaftet war.

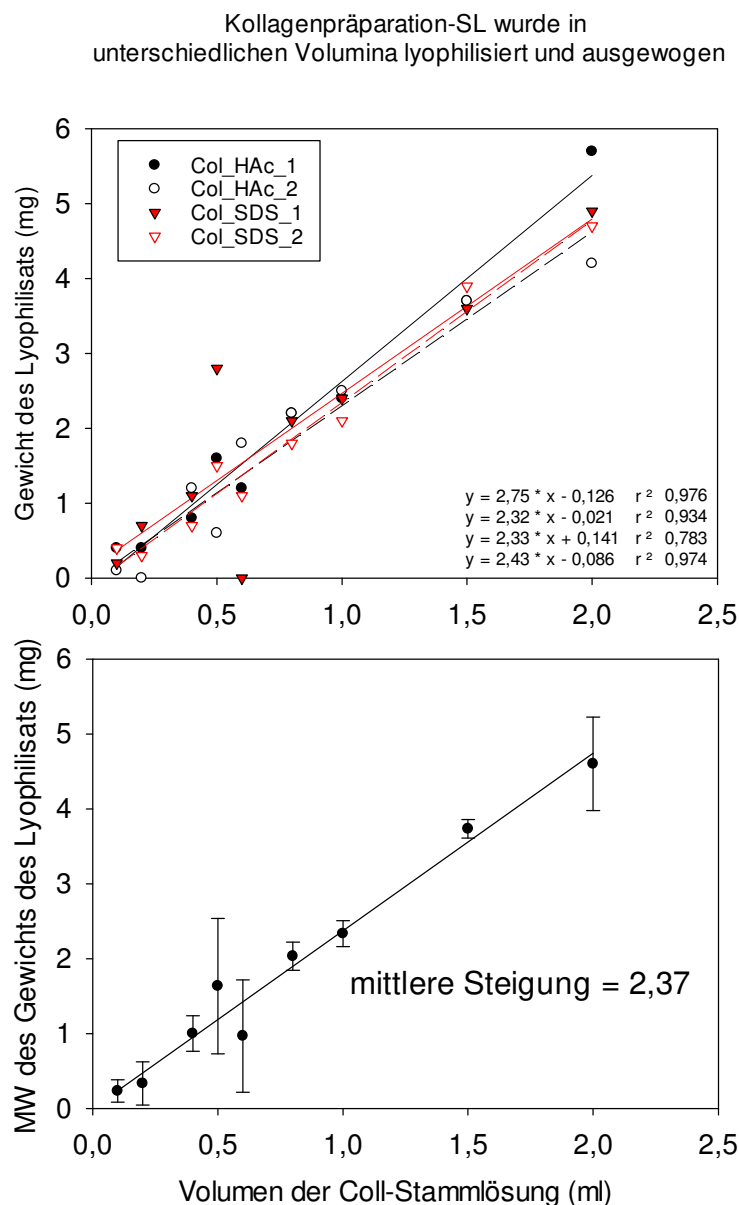


Abbildung 7: oben: Darstellung der einzelnen Gewichte der Lyophilisate in Abhängigkeit des Volumens der Coll-Stammlösung in mg als Doppelbestimmung für Kollagen in 0,1% HAc, bzw. 2% SDS. Eingesetzt wurde jeweils 1ml. Mit dem Korrelationskoeffizient r^2 nahe 1 liegt eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen linearen Zusammenhang zwischen y , dem Gewicht der Lyophilisate und x , dem Volumen der Kollagenstammlösung vor. Unten: Ermittlung der Konzentration über die mittlere Steigung der Lyophilisate im linearen Bereich auf Grundlage der oben ermittelten Gewichte. Die Konzentration der Kollagen-

Stammlösung lag bei 2,37mg/ml. Die Lyophilisate wurden in einer Doppelbestimmung in je 1ml 0,1% HAc bzw. 2% SDS aufgenommen und im BCA eingesetzt.

4.2.2 Etablierung des BCA zur Konzentrationsbestimmung

Üblicherweise dient Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin) als Referenzprotein (siehe 2.2.2.2) im BCA-Test. Eine bekannte Menge BSA wurde in einem definierten Volumen Lösungsmittel (0,1% HAc bzw. 2% SDS) gelöst, verdünnt und dann im BCA-Test die Absorption bestimmt. Ebenso wurde mit einer lyophilisierten - und einer ausgewogenen Kollagenprobe verfahren. Eine Lösung mit reinem Kollagen (gekauft, in 0,1% HAc mit bekannter Konzentration, Coll_R) wurde ebenfalls mit 0,1% HAc verdünnt und die Konzentration bestimmt. Abbildung 8 stellt die gemessenen Absorptionswerte (OD, optische Dichte) in Abhängigkeit von der vorgegebenen Konzentration der Proteinlösungen gegenüber. Die Absorptionswerte für BSA waren im Mittel um Faktor 4 höher als für reines Kollagen bzw. für die Kollagenpräparate. Mit dem Einsatz von BSA wären somit falsch hohe Werte als Konzentrationsangabe für Kollagen zu erwarten. Somit muss im BCA-Test zur Konzentrationsbestimmung von Kollagen eine Kollagenlösung mit bekannter Konzentration als Referenz verwendet werden.

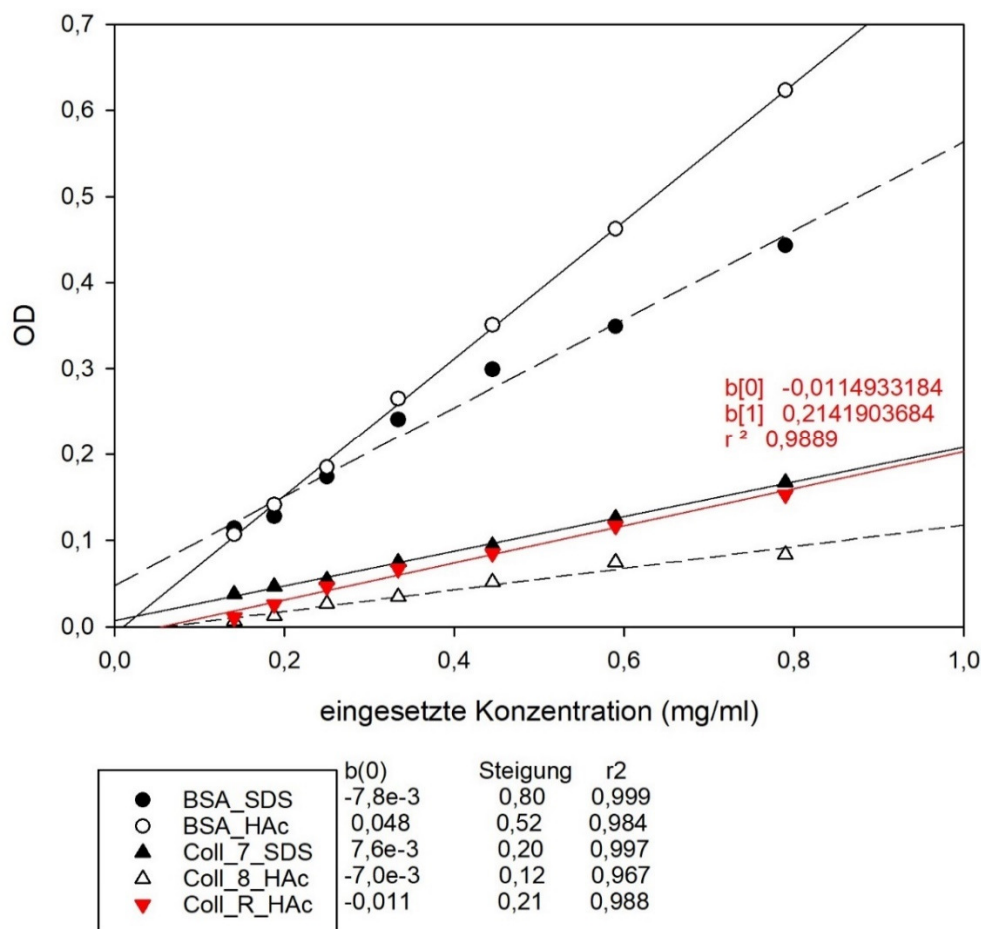


Abbildung 8: BCA-Test: BSA als Referenzprotein ist ungeeignet. $B(0)$ = Schnittpunkt mit der x-Achse, $b(1)$ = Steigung, r^2 = Korrelationskoeffizient. OD = Absorptionswert im BCA.

Die Steigungen der Kollagenproben in Abbildung 8 waren im verwendeten Konzentrationsbereich sehr niedrig (0,2 für 2% SDS und 0,12 für 0,1% HAc). Die Durchführung des BCA-Tests mit Kollagenproben, die in 0,1% HAc gelöst sind, mit dem Ziel reproduzierbare Ergebnisse zu liefern, wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Wir lyophilisierten daher unterschiedliche Volumina einer Kollagenstammlösung (nach 3xNaOH, mit bekannter Konzentration, 2,37mg/ml) und lösten diese in 1ml 0,1% HAc bzw. 2% SDS wieder auf. Anschließend wurde diese Lösung in den BCA-Test eingesetzt. In 0,1% HAc (Abbildung 9) lagen die Absorptionswerte immer $< 0,5$. Bis zu einem Volumen von 0,7ml (dies entspricht einer Kollagenmenge von $0,7\text{ml} \times 2,37\text{mg/ml} = 1,66\text{mg}$) zeigte sich eine lineare Abhängigkeit. Als Mengenangabe ist die Konzentration in mg/ml angegeben, da die lyophilisierten Proben in 1ml 0,1% HAc aufgenommen wurden. Bei höheren Volumina/Kollagenmengen blieb der Absorptionswert unverändert. In 2% SDS (Abbildung 10) wurden mit steigendem Volumen/Kollagenmenge höhere Absorptionswerte gemessen als für

die HAC-Proben. Der lineare Bereich reichte bis 1ml Volumen (entspricht einer Kollagenmenge von 2,37mg). Danach flachte die Kurve ab. Im linearen Bereich (Absorption vs. gemessene Kollagenkonzentration) wurde eine mittlere Steigung von 0,23 berechnet. D.h. die Konzentration einer unbekannten Probe errechnet sich aus der Multiplikation des Absorptionswerts mit dem Kehrwert der Steigung.

Schlussfolgerung: Kollagen ist in 0,1% HAC bis zu einer Konzentration von 1,7mg/ml löslich, in 2% SDS dagegen beträgt die Löslichkeit etwa 2,4mg/ml. Standardkurven sind also zur Konzentrationsbestimmung von Kollagen möglich, jedoch muss die Löslichkeit beachtet werden.

lyophilisierte Kollagenpräparation in HAC aufgenommen, BCA-Test

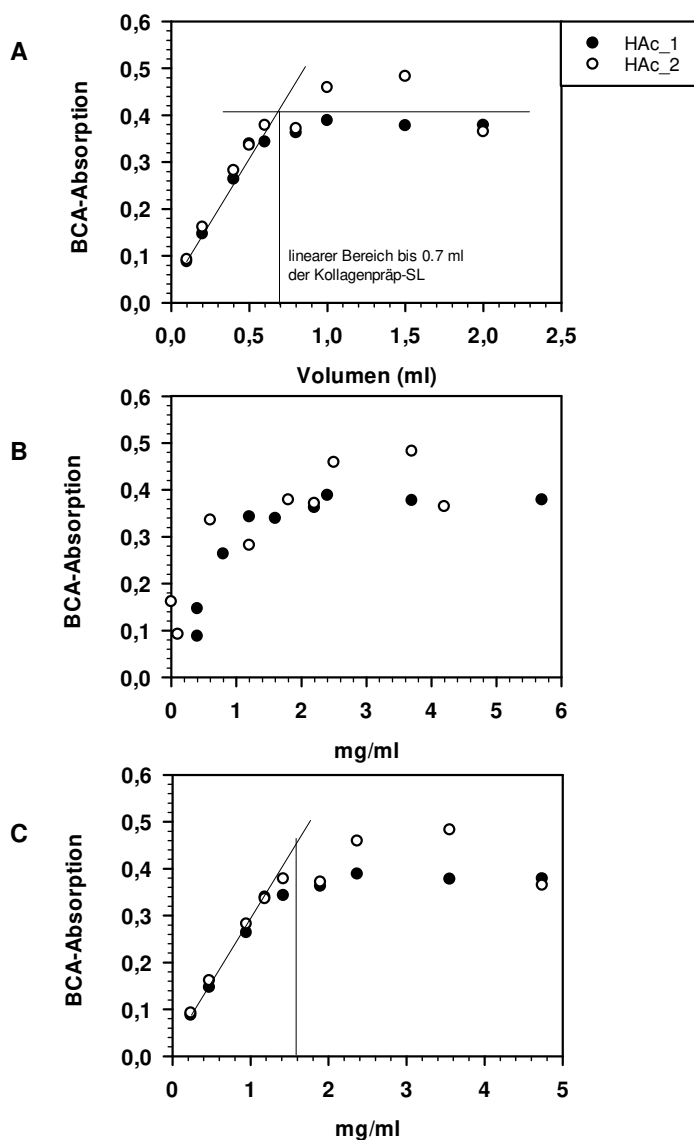


Abbildung 9: Proben 1x aufgetaut, lyophilisiert und in 0,1% HAC gelöst, Konzentrationsermittlung über die Steigung im linearen Bereich A: Einzelwerte aus einer Doppelbestimmung und Ermittlung des linearen Bereichs, B: Darstellung der Werte nach Einberechnung der mittleren Steigung aus Abb. 7 und damit Ermittlung der Konzentration in mg/ml, C: alle Einzelwerte wurden gemittelt und anhand der Steigung die Konzentration der Stammlösung ermittelt. Hier entsprechen 0,7ml Stammlösung einer Konzentration von 1,66mg/ml.

lyophilisierte Kollagenpräparation in SDS aufgenommen, BCA-Test

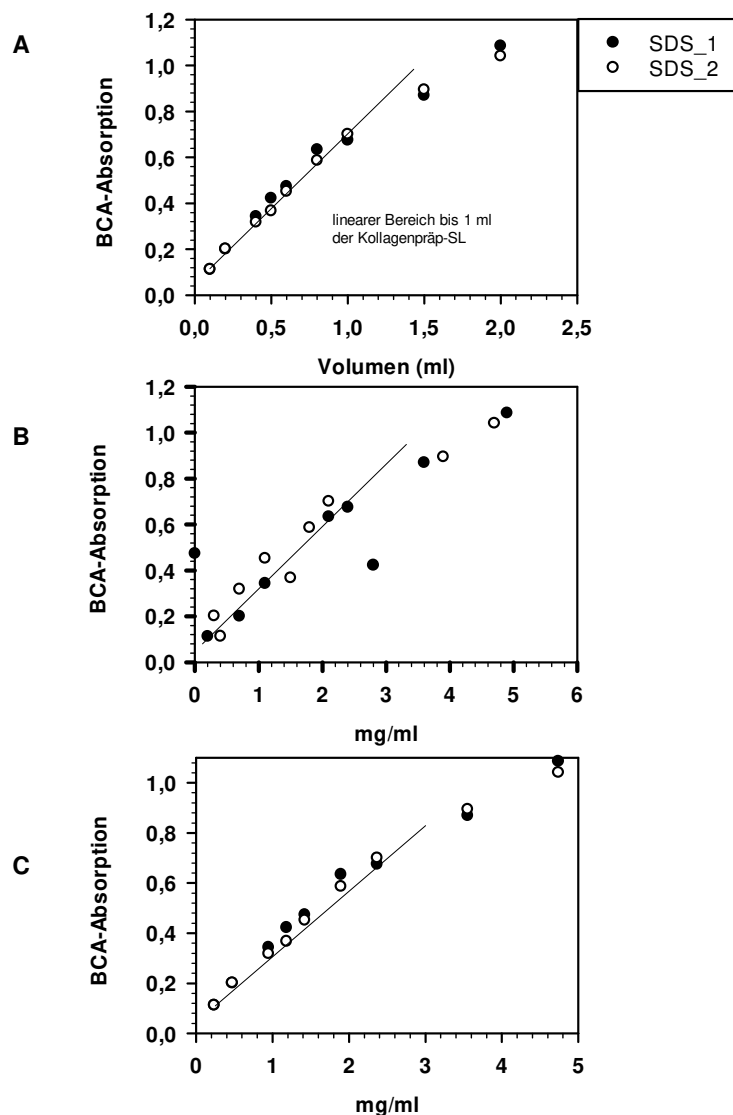


Abbildung 10: Proben 1x aufgetaut, lyophilisiert und in 2% SDS gelöst, Konzentrationsermittlung über die Steigung im linearen Bereich A: Einzelwerte aus einer Doppelbestimmung und Ermittlung des linearen Bereichs, B: Darstellung der Werte nach Einberechnung der mittleren Steigung aus Abb. 7 und damit Ermittlung der Konzentration in mg/ml, C: alle Einzelwerte wurden gemittelt und anhand der Steigung die Konzentration der Stammlösung ermittelt. Hier entsprechen 1ml Stammlösung einer Konzentration von 2,37mg/ml.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die in 0,1% HAc gelösten Kollagenproben lyophilisiert und in 2% SDS wieder aufgenommen. Zum einen konnten wir dadurch den BCA durchführen, zum anderen konnten die gleichen Proben in einem SDS-Page zur Reinheitsprüfung eingesetzt werden.

Ziel war es, die Standardkurve mit unserer hergestellten Kollagen-Stammlösung unter Verwendung von 2% SDS als Puffer zu etablieren. Dazu wurde die Stammlösung, als auch die gekaufte Kollagenlösung lyophilisiert, ausgewogen und mit 2% SDS aufgelöst. Abbildung 11 zeigt, dass unsere Kollagen-Typ1-Stammlösung als Standard zur Konzentrationsbestimmung verwendet werden kann.

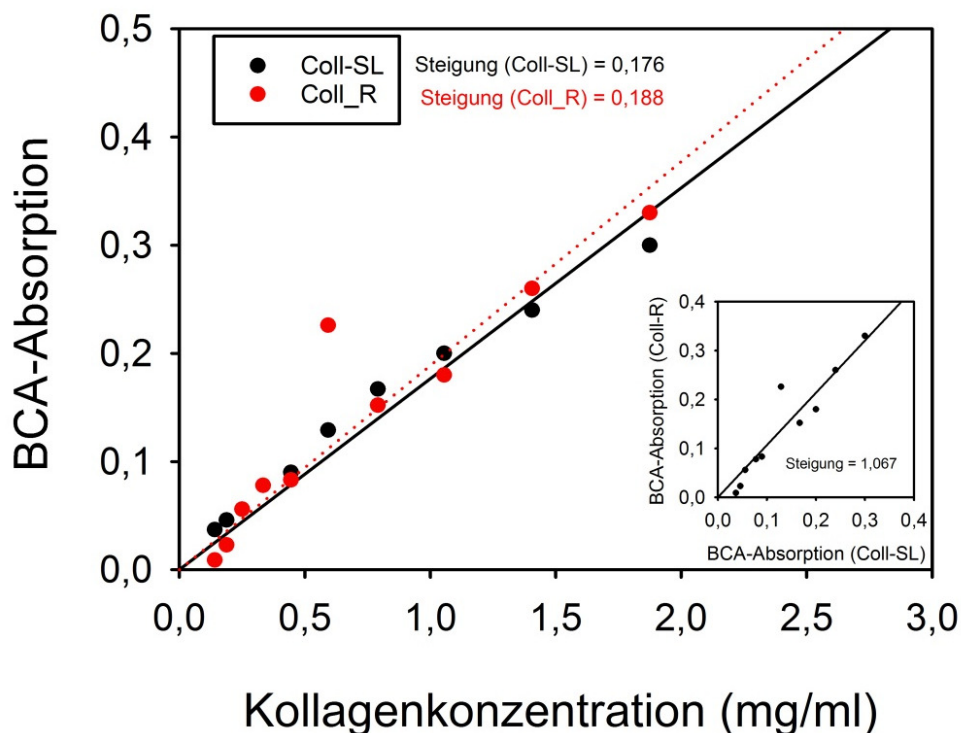


Abbildung 11: Standardkurve von gekauften Kollagen-Typ-1 (Coll_R) und selbst hergestelltem Kollagen-Typ-1 (Coll-SL). Kollagen wurde lyophilisiert, ausgewogen, in einem definierten Volumen aufgenommen (Kollagenkonzentration in mg/ml) und dann mittels BCA-Test die Absorption bestimmt. Es ergab sich für beide Kollagen-Chargen eine lineare Abhängigkeit (Regressionslinien). Insert: Gegenüberstellung der Absorptionswerte beider Chargen mit einer 1:1 Abhängigkeit.

Es ist also möglich, den BCA-Test anzuwenden, um in einer Kollagenlösung die Konzentration zu bestimmen. Dazu müssen die Proben lyophilisiert und in 2% SDS als Puffer gelöst werden. Als Referenzprotein verwendeten wir unsere hergestellte Stammlösung. Somit ließen sich die Konzentrationen der weiteren Kollagenpräparationen zuverlässig ermitteln.

4.2.3 SDS-Page

Zur Überprüfung der Reinheit des Kollagens wurde ein SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt. Da sich dieses Verfahren auch zur Konzentrationsbestimmung eignet, wurde zunächst eine Probe aus einer Kollagenpräparation mit bekannter Konzentration (durch lyophilisieren, Bestimmung des Trockengewichts, BCA-Test) in 2% SDS angesetzt, verdünnt (Tabelle 13) und eine SDS-PAGE mit Coomassiefärbung durchgeführt. Die 4 Hauptbanden (Abbildung 12) wurden nach dem SDS-Page densitometrisch mit ChemiDoc™ und der Software Imagelab ausgewertet. Abbildung 12 zeigt die

Konzentrationsabhängigkeit (Standardkurve) im Gel, Abbildung 13 die Korrelation zwischen Kollagenkonzentration mit den densitometrisch gemessenen Bandenintensitäten.

Spur #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kollagen (mg/ml)	2,5	1,88	1,40	1,06	0,79	0,59	0,45	0,33	0,25	0,19

Tabelle 13: Verdünnungsreihe, Standardkurve.

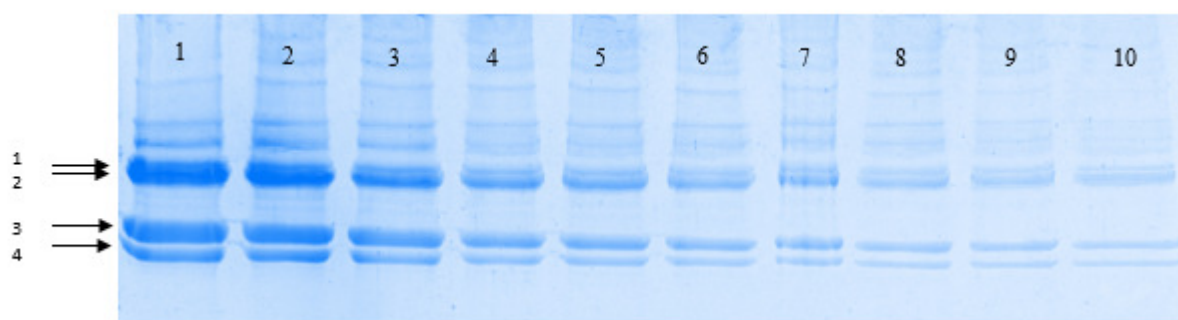


Abbildung 12: SDS-Page mit Coomassiefärbung. Standardkurve der selbst hergestellten Kollagenstammlösung. Spurnummern analog zu den Konzentrationsangaben in Tabelle 13.

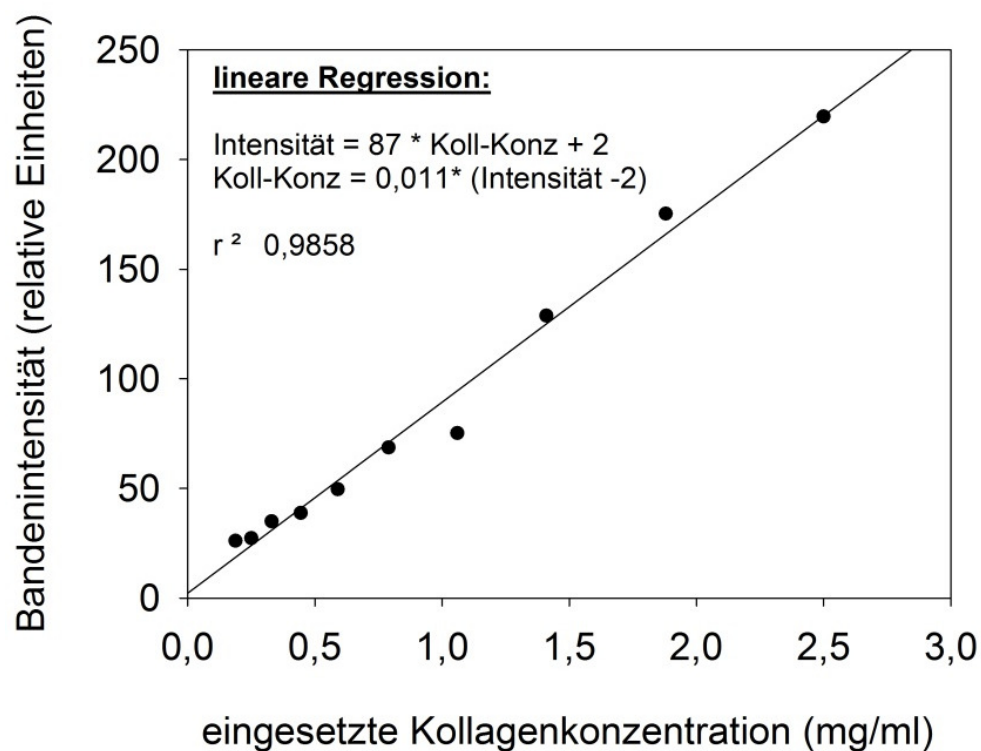


Abbildung 13: Standardkurve. Gegenüberstellung der eingesetzten Konzentration gegen die Bandenintensität (aller 4 Kollagenbanden im Coomassie-Gel).

Aus Abbildung 13 lässt sich eine lineare Regression der Daten mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,986 ableiten. Die Konzentration einer unbekannten Probe kann mit der Formel

$$\text{Kollagen-Konzentration} = 0,011 * (\text{Bandenintensität} - 2)$$

ermittelt werden. Die SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung wurde anschließend benutzt, um die Konzentration und die Reinheit von ausgewählten Proben unterschiedlicher Präparationen zu bestimmen. Abbildung 14 zeigt ein gefärbtes Gel, bei dem ausgewählte Proben aus einer Kollagenpräparation (3 Beobachter – A, C, K) aufgetragen wurden.

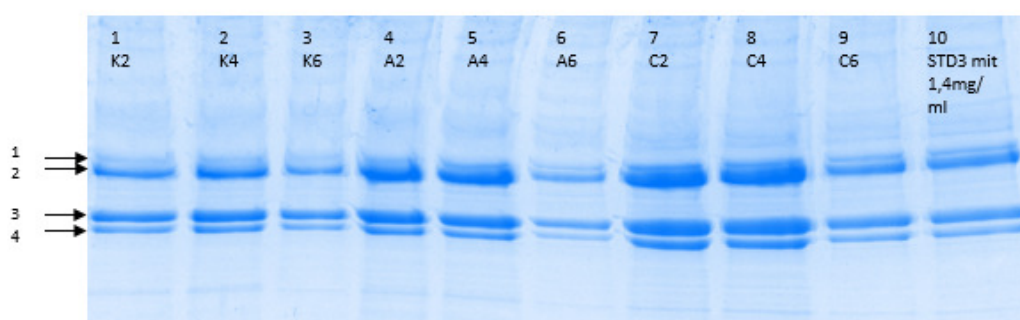


Abbildung 14: Kollagengehalt im SDS-Page/ Coomassie, Vergleich aus 3 Präparationen (3 Beobachter: K; C; A), A2, C2, K2 = Rohkollagen, A4, C4, K4 = Pellet nach 1xNaOH, A6, C6, K6 = Pellet nach 3xNaOH. STD = selbst hergestelltes Kollagen nach 3xNaOH mit bekannter Konzentration. Verwendet wurden jeweils 10µl.

Für die SDS-Page wurde vorab die Konzentration der Proben mit einem BCA-Test (Abbildung 11) bestimmt. Pro Geltasche wurde immer 10µl Protein aufgetragen. Abbildung 15B spiegelt die Konzentration in Abhängigkeit zur Intensität wider. Die Konzentration der Fraktionen „Rohkollagen“ (A2, A4, C2, C4, K2, K4) lagen um etwa Faktor 2 höher als die der Fraktionen mit „aufgereinigtem“ Kollagen (A6, C6, K6). Dies wurde mit beiden Messmethoden verifiziert (BCA-Test, Abb. 15A und SDS-Page, Abb. 15B). Im Vergleich zum SDS-PAGE lieferte der BCA-Test um den Faktor 1,3 höhere Werte (Abbildung 15D). Der prozentuale Anteil der Einzelbanden im Vergleich zur Gesamtintensität (aller Hauptbanden) war für alle Proben gleich (Abbildung 15C). Bande 1, 2, 3 und 4 entsprachen jeweils $17 \pm 1\%$, $36 \pm 3\%$, $13 \pm 2\%$ und $34 \pm 2\%$ von der Gesamtintensität. Die drei Neutralisationsschritte bewirkten keine Erhöhung der Reinheit. Zusätzlich stellten wir in unserem Vergleich mit gekauften Kollagen fest, dass unser eigens hergestelltes Kollagen die gleiche Reinheit wie gekauftes Kollagen besaß (hier nicht dargestellt).

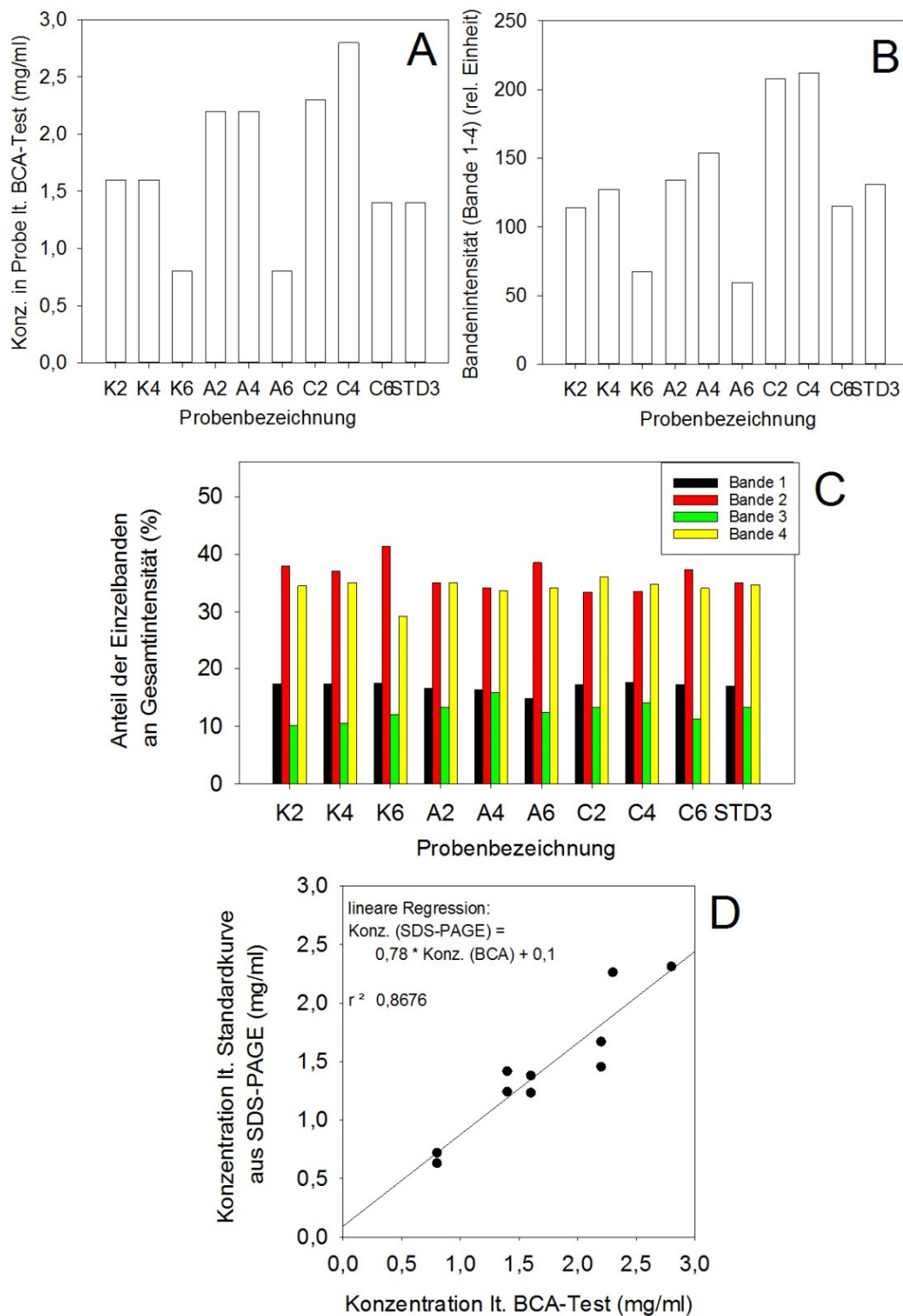


Abbildung 15: Densitometrische Auswertung des Gels aus Abbildung 14. (A) Konzentration der Probe laut BCA-Test. (B) Summe der Intensität der 4 Hauptbanden. (C) Darstellung des Anteils der Einzelbanden 1-4 im Verhältnis zur Gesamtintensität der Banden 1-4. (D) Gegenüberstellung der ermittelten Konzentration aus BCA-Test und der Intensität aus dem SDS-Page.

4.3 Vorüberlegungen zur Etablierung eines CGC

4.3.1 Passage der Zellkultur vs. Kontraktionsfähigkeit

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben, welche Zellpassagen am besten geeignet sind. Liu et al. 2001 verwendet humane fetale Lungenfibroblasten in der Passage 16-20, humane bronchiale Fibroblasten der Passage 10-16, sowie bronchiale Fibroblasten eines Patienten mit zystischer Fibrose in der Passage 5-10. Laut Steinberg et al. 1980 gehen frühe Passagen mit einer besseren Kontraktion einher, als Spätere. Ein signifikanter Unterschied wurde damals allerdings erst ab Passage 15 gezeigt. In unserem Versuchsmodell zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Passagen 4-12 innerhalb der Kontrollgruppen (Abbildung 16). Die jeweilige Zellpassage war daher nicht entscheidend für die Ergebnisse.

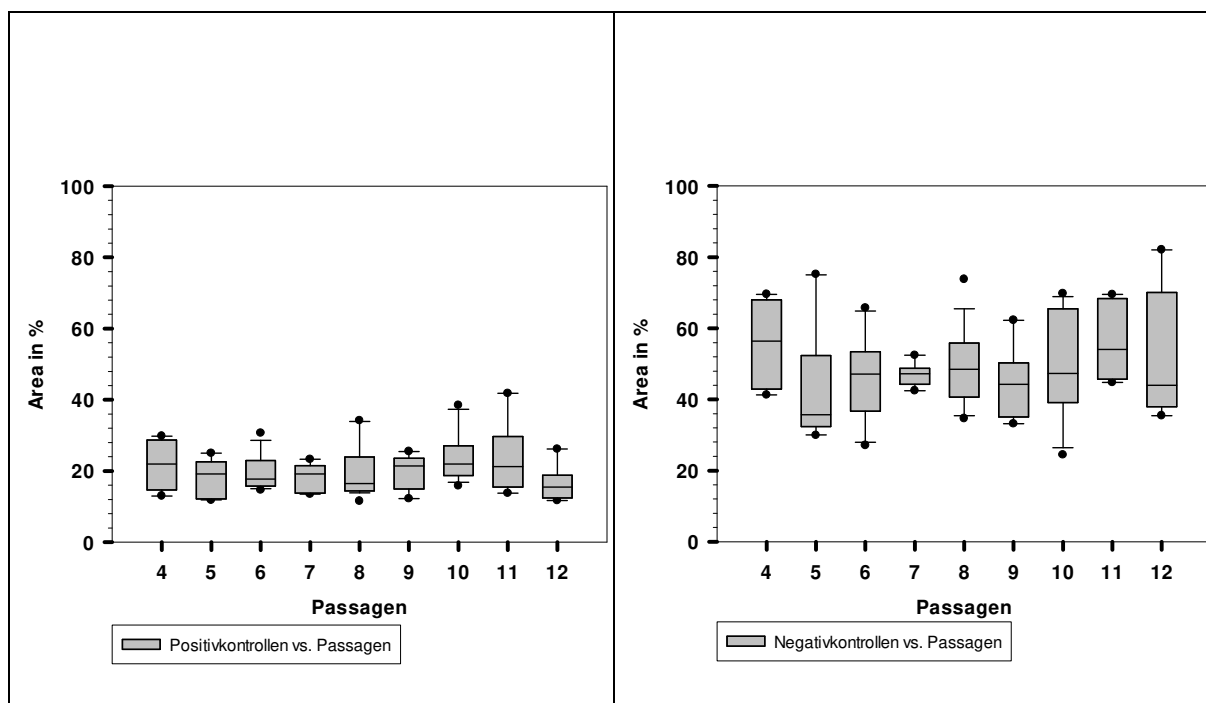


Abbildung 16: Vergleich der Kontraktionskraft der Positiv- und Negativkontrollen vs. Passagenabhängigkeit. Links = Positivkontrollen, rechts: Negativkontrollen. Einbezogen wurden alle Einzelwerte der verschiedenen Kulturen aus Rattenlungenfibroblasten. Passage 4 n=8, Passage 5 n=10, Passage 6 n=16, Passage 7 n=6, Passage 8 n=19, Passage 9 n=8, Passage 10 n=14, Passage 11 n=8, Passage 12 n=8. Der Stoffwechsel wurde zuvor durch das serumfrei setzen reduziert (nicht aktivierte Zellen). Zellzahl $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well, Rohkollagenkonzentration 1mg/ml. Keine Signifikanz zwischen den Passagen innerhalb der Positivkontrollen ($p=0,186$) und der Negativkontrollen $p=0,266$ (One Way ANOVA). Zwischen den Positiv- und Negativkontrollen $p<0,001$ (Paired t-test).

Passage	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	p12
---------	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----

Anzahl N	4	5	9	3	8	2	5	3	4
Einzelversuche n	8	10	14	6	19	8	14	8	8
Area in %	21,8	18 ±	19,7 ±	18,3	19,8 ±	20,1	24,0 ±	23,5	16,5
± SD	± 6,6	5,5	5,0	± 3,9	7,1	± 4,9	6,8	± 9,3	± 4,8

Tabelle 14: Daten zu Abbildung 16; Positivkontrollen: Daten zum Vergleich der Kontraktionskraft zwischen den Passage 4-12. Die Fläche wurde als Mittelwert ± SD angegeben, p=0,186.

Passage	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	p12
Anzahl N	4	5	9	3	8	2	5	3	4
Einzelversuche n	8	10	14	6	19	8	14	8	8
Area in %	55,9	43,9	46,0	47,0	50,1	44,4	48,7	56,3	51,0
± SD	± 12,8	± 16,9	± 12,0	± 3,3	± 11,0	± 9,7	± 14,3	± 11,1	± 18,4

Tabelle 15: Daten zu Abbildung 16. Negativkontrollen: Daten zum Vergleich der Kontraktionskraft zwischen den Passage 4-12. Die Fläche wurde als Mittelwert ± SD angegeben, p=0,266.

4.3.2 Einfluss von Serumentzug auf die Zellvitalität

Vor Einsetzen in den CGC mussten die Zellen serumfrei gesetzt werden, um den Stoffwechsel zu reduzieren. In einem Vorversuch wurde die Vitalität der Zellen nach Serumentzug untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Fibroblastenkulturen in 96-well-MTP kultiviert und nach Mediumwechsel (Kulturmedium ohne - und mit unterschiedlichen FKS-Konzentrationen) die Zellzahl bzw. die Stoffwechselleistung (MTS-Absorption) bestimmt. Wie in Abbildung 17 ersichtlich, bewirkt Serumentzug nur eine geringe Abnahme der Zellzahl (8% bzw. 12%), während die Stoffwechselleistung der Zellen ohne FKS nach 24h um 24% bzw. 19% niedriger, als zum Zeitpunkt des Serumentzugs war. Ab einer Konzentration von 5% FKS nahm die Zellzahl und die Stoffwechselleistung zu.

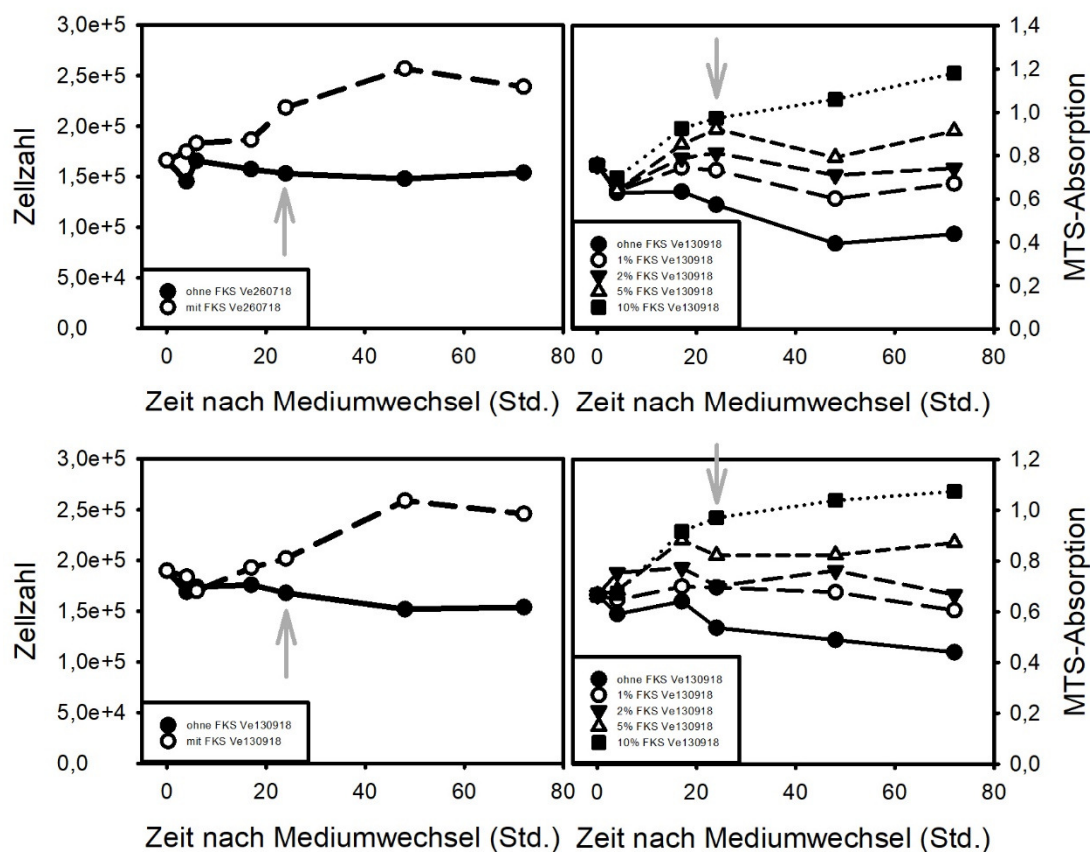


Abbildung 17: Serumentzug bewirkt eine Hemmung der Proliferation und eine Abnahme der Stoffwechselleistung (MTS-Test) der Fibroblasten. Zwei Fibroblastenkulturen wurden in 96-well-MTP kultiviert. Nach Serumentzug (Zeit = 0) blieb die Zellzahl (links) konstant, während die MTS-Absorption (rechts) über 24h um 24% bzw. 19% abnahm. Am Ende des Versuches nach 72h lag die MTS-Antwort bei 58% bzw. 66% des Ausgangswertes. Bei geringen FKS-Konzentrationen (1 und 2%) blieb die Stoffwechselleistung konstant. Die Zugabe von 10% FKS im Kulturmedium bewirkte eine Zunahme der Zellzahl und der MTS-Reaktion.

4.4 Etablierung eines CGC unter Verwendung von 3x NaOH

Der CGC wird verwendet, um die Kontraktionsfähigkeit von Zellen in vitro zu untersuchen, da er ähnliche Eigenschaften wie die Wundheilung in vivo zeigt. Er dient u. a. zur Testung von Proliferationsinhibitoren. Nach Einführung des Isolierungsprotokolls von Kollagen nach Bell et al. 1979 wurde die aufgereinigte Kollagenfraktion (3xNaOH) verwendet, um die Variablen für die Kontraktionsstärke des CGC zu optimieren. Als Grundlage wurde die Arbeit von Liu et al. 2001 herangezogen: Diese arbeiteten mit Fibroblasten, die mit und ohne dem Wachstumsfaktor TGF- β (ohne FKS) vorbehandelt waren. In der Regel wurde bei diesen Versuchen kein Serum für den CGC (weder im Gel noch im Überstand) verwendet.

4.4.1 Vergleich Aktivierte - vs. Nicht aktivierte Zellen

Analog zu dem Vorversuch aus 3.3.2 wurden die Zellen entweder in Kulturmedium mit 10% FKS („aktivierte Zellen“) oder ohne FKS („nicht-aktivierte Zellen“) für 4h inkubiert, bevor sie für den CGC abgelöst wurden. Die Kollagenkonzentration (3x NaOH) betrug 1mg/ml. Im Gel wurde kein FKS eingesetzt. Der Überstand über dem Gel enthielt Kulturmedium ohne (0% Gel 0% ÜS) bzw. mit 10% FKS (0% Gel 10% ÜS). Die Gelfläche wurde nach 24h bestimmt.

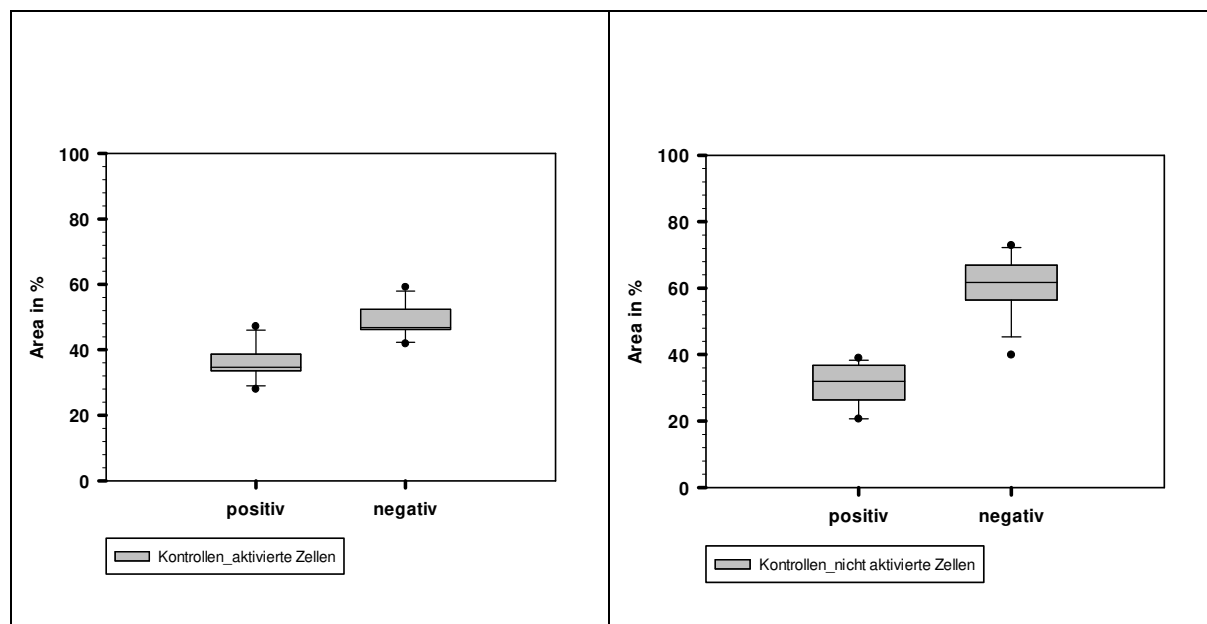


Abbildung 18: Einfluss von FKS im Überstand über dem Kollagengel auf die Kontraktionskraft. Links: aktivierte Fibroblasten, Vorbehandlung mit 10% FKS (n=11). Rechts: nicht-aktivierte Fibroblasten, Vorbehandlung 4h serumfrei (n=13). Zellzahl $4,5 \times 10^5$ /Well, Kollagen nach 3xNaOH (1mg/ml). Im Gel kein FKS, im Überstand (ÜS) 0% bzw. 10% FKS. Beobachtung 24h. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken, $p < 0,001$.

Zellen	Aktivierte Zellen	Aktivierte Zellen	Nicht aktivierte Zellen	Nicht aktivierte Zellen
Testbedingungen	0%Gel 0%FKS	0%Gel 10%FKS	0%Gel 0%FKS	0%Gel 10%FKS
Anzahl N	6	6	7	7
Einzelversuche n	11	11	13	13
Area in % \pm SD	48 ± 5	36 ± 5	61 ± 9	31 ± 6

Tabelle 16: Daten zu Abbildung 18. Vergleich der Kontraktionskraft zwischen aktivierten und nicht aktivierten Zellen in Abhängigkeit von der Zugabe von 10% FKS in den Überstand. Die Fläche wurde als Mittelwert \pm SD angegeben, $p < 0,001$.

Wie in Abbildung 18 ersichtlich, betrug die Restfläche bei den aktivierten Zellen ohne FKS im Überstand $48 \pm 5\%$ ($n=11$), bei den nicht-aktivierten Zellen $61 \pm 9\%$ ($n=13$) $p < 0,001$. Die Zugabe von 10% FKS in den Überstand verstärkte signifikant die Kontraktionskraft der jeweiligen Zellen (aktivierte Zellen, $36 \pm 5\%$; nicht-aktivierte Zellen, $31 \pm 6\%$; $p < 0,001$). Daraus ergibt sich ein Faktor für die Reduktion der Kontraktionskraft unter Einsatz von 10% FKS in den Überstand des CGC bei aktivierten Zellen von 1,3 und bei nicht aktivierten Zellen von 1,9. Die Stärke der Kontraktionskraft ist also maßgeblich vom Einsatz von 10% FKS in den Überstand des CGC abhängig. Man kann sowohl aktivierte-, als auch nicht-aktivierte Zellen verwenden. Die Wirkung von 10% FKS ist für nicht-aktivierte Zellen höher.

4.4.2 Zellzahl vs. Kontraktionskraft

Die Kontraktionskraft verhält sich direkt proportional zur Zellzahl und indirekt proportional zur Kollagenkonzentration (Eckes et al. 2000, S. 327; Bell et al. 1979). Diese Theorie wurde in den nachfolgenden Versuchen überprüft. Für die Versuche benutzten wir aktivierte Zellen, sowie Kollagen nach 3xNaOH. Der Überstand bestand aus 500 μ l DMEM + 10% FKS. Abbildung 19 zeigt den Einfluss der Zellzahl im Gel (3x NaOH, 1mg/ml) auf die Kontraktion (Area in %). Bei einer eingesetzten Zellzahl zwischen $1,0e^5$ /Well und $4,5e^5$ /Well lag die Kontraktion bei $47 \pm 14\%$ ($1e^5$, $n=4$), $53 \pm 14\%$ ($2,5e^5$, $n=2$) und $61 \pm 15\%$ ($4,5e^5$, $n=4$). Bei der höchsten Zellzahl pro Well wurde eine um Faktor 1,5 höhere Kontraktion ($34 \pm 7\%$, $n=2$) beobachtet. Die Kultivierung solch hoher Zellzahlen ist mit einem hohen Material- und Zeitaufwand verbunden. Für weitere Versuche wurden $4,5e^5$ Zellen/Well bei gleicher Kollagenkonzentration eingesetzt.

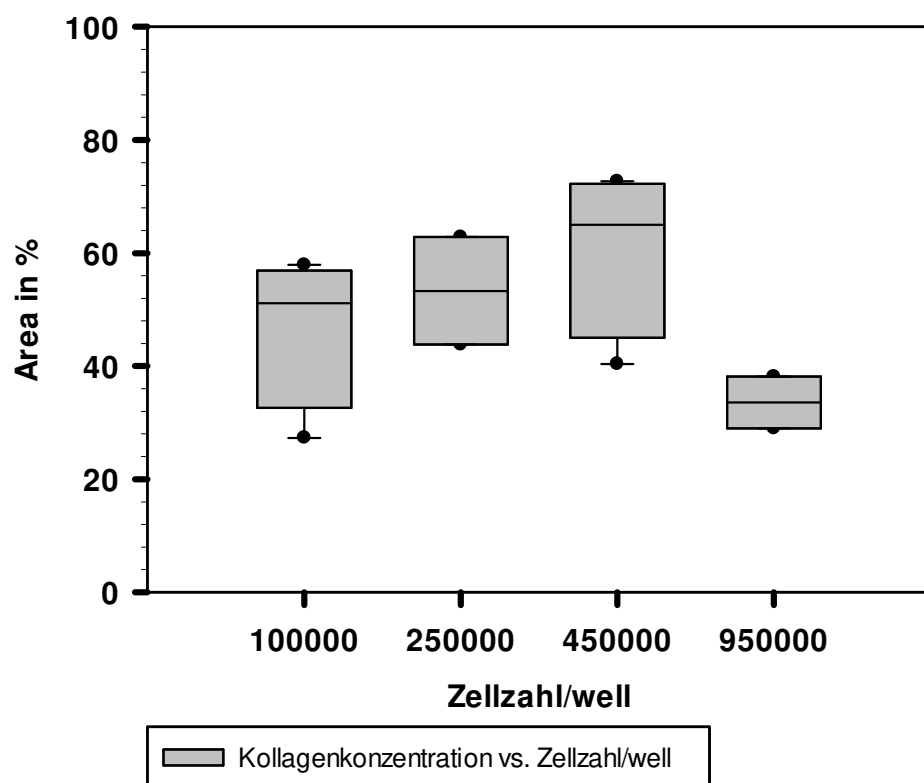


Abbildung 19: Vergleich der Kontraktionsstärke in Abhängigkeit der Zellzahl.

Unterschiedliche Zellzahlen von aktivierten Zellen wurden in den CGC (3xNaOH, 1mg/ml) eingesetzt. Die Restfläche (Area in %) wurde nach 24h bestimmt. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken. Bei kleiner Probengröße keine Statistik.

Zellzahl/Well	1e ⁵	2,5e ⁵	4,5e ⁵	9,5e ⁵
Anzahl N	3	1	3	1
Anzahl Einzelversuche	4	2	4	2
Area in % ± SD	47 ± 14	53 ± 14	61 ± 15	34 ± 7

Tabelle 17: Daten zu Abbildung 19. Auswertung Zellzahl/Well vs. Kontraktionsstärke, Kollagenkonzentration 1mg/ml, aktivierte Zellen, alle Werte wurden als Mittelwerte ± SD angegeben.

4.4.3 Kollagenkonzentration vs. Kontraktionsstärke

Abbildung 20 zeigt vergleichbare Kontraktionswerte bei unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen. Wir konnten jedoch beobachten, dass bei geringerer Konzentration die Gelmatrix nicht ausreichend zur Ausbildung kam (bildlich hier nicht dargestellt). Dadurch

war die Handhabung, insbesondere das Lösen des Gels mit der Pipettenspitze, erschwert. Weitere Versuche wurden aus diesem Grund mit 1mg/ml Kollagen durchgeführt. Bei $n=2$ erfolgte keine Statistik.

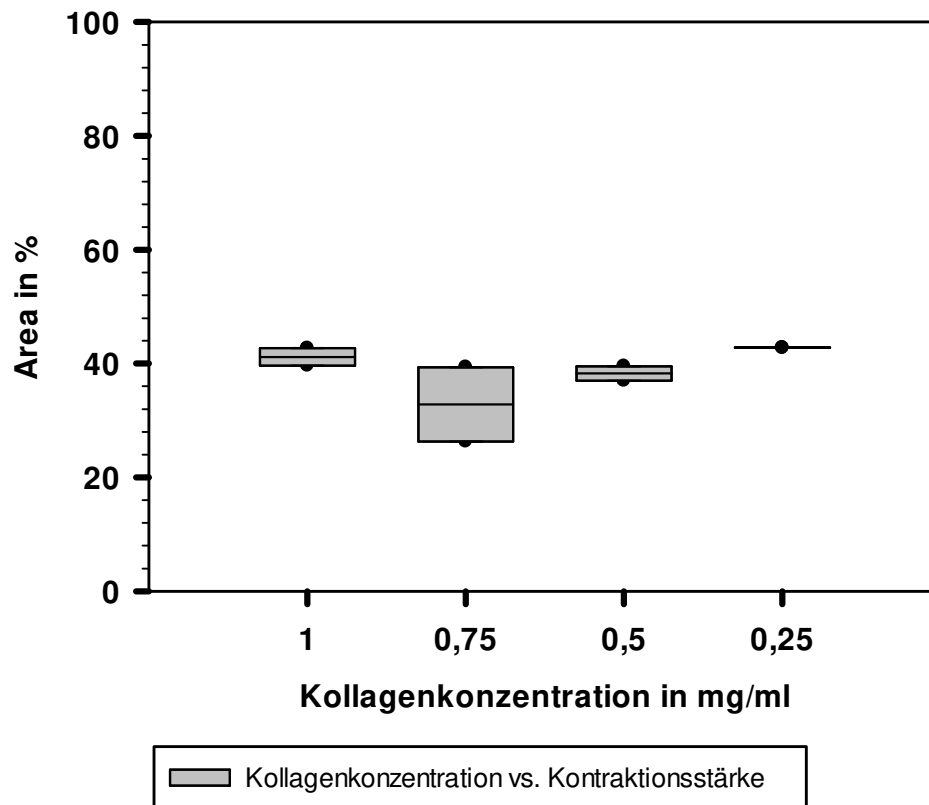


Abbildung 20: Vergleich der Kontraktionsstärke in Abhängigkeit der Kollagenkonzentration. Unterschiedliche Kollagenkonzentrationen (3x NaOH) wurden hergestellt und aktivierte Zellen ($4,5e^5$ /Well) zugesetzt. 24h Beobachtung. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken. Bei $n=2$ erfolgte keine Statistik.

Kollagenkonzentration in mg/ml	1	0,75	0,5	0,25
Anzahl Einzelversuche	2	2	2	2
Area in %	43 ± 0	38 ± 2	33 ± 9	41 ± 2

Tabelle 18: Daten zu Abbildung 20.

Bisher zeigten die Ergebnisse keine Abhängigkeiten zwischen der Zellzahl bzw. der Kollagenkonzentration und der Kontraktionsstärke (im Gegensatz zur Literatur). Zudem war die Kontraktionskraft unter den beschriebenen Bedingungen, aktivierte Zellen, Kollagen nach 3xNaOH und einer Konzentration von 1mg/ml, sowie $4,5e^5$ Zellen/Well stark unterschiedlich

(Abbildung 18: $36 \pm 5 \%$; Abbildung 19: $61 \pm 15 \%$; Abbildung 20: $43 \pm 0 \%$). Bei Fehlen des Stimulus FKS im Überstand war die Kontraktionskraft bei den aktivierten Zellen lediglich um 12% schwächer (Abbildung 18 links, Tabelle 16). Aus den Versuchen mit nicht-aktivierten Zellen (Abbildung 18 rechts, Tabelle 16) konnte ein größerer Unterschied zwischen FKS-stimulierten und FKS-freien Bedingungen gezeigt werden. Es wurden daher alle weiteren Versuche mit nicht-aktivierten Zellen durchgeführt.

4.4.4 Überprüfung der FKS-Variablen im CGC

Aus der Literatur waren keine eindeutigen Bedingungen für den CGC ableitbar. So hat Gillery et al. 1986 den Einfluss der FKS-Konzentration im Überstand eines CGC untersucht. Hinsichtlich der Kontraktionsstärke lag der größte Effekt zwischen 0% FKS- und 10% FKS im Überstand (10% FKS im Gel war stets vorhanden). Liu et al. 2001 arbeiteten in ihrer Arbeit ohne FKS im Gel. Wir untersuchten daher folgende Testbedingungen bzw. Varianten:

1. 0% FKS im Gel, 0% FKS im Überstand
2. 10% FKS im Gel, 0% FKS im Überstand
3. 0% FKS im Gel, 10% FKS im Überstand
4. 10% FKS im Gel, 10% FKS im Überstand

Konstante Bedingungen: Einsatz von $4,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well (nicht aktivierte Zellen), Kollagen nach 3xNaOH in einer Konzentration von 1mg/ml. Mit 0% FKS im Gel und 0% FKS Im Überstand war die Kontraktionskraft am geringsten. Durch die Zugabe von 10% FKS in den Überstand und gleichzeitigem Fehlen von FKS im Gel kam es zu einer maximalen Kontraktion, die auch durch die zusätzliche Gabe von 10% FKS in das Gel nicht erreicht bzw. gesteigert werden konnte. Demzufolge hat 10% FKS im Gel offensichtlich keine Auswirkung auf die Kontraktionskraft. Für die Negativ- und Positivkontrollen definierten wir daher folgende Bedingungen:

Negativkontrolle = 0% FKS im Gel, 0% FKS im Überstand

Positivkontrolle = 0% FKS im Gel, 10% FKS im Überstand

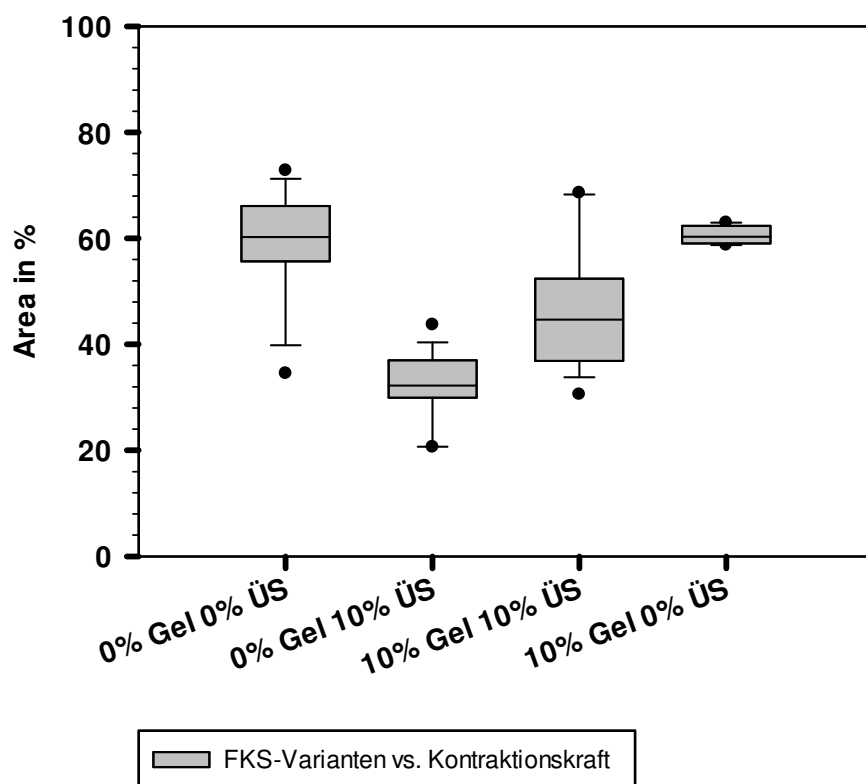


Abbildung 21: Vergleich verschiedener FKS-Varianten auf die Kontraktionskraft nicht aktivierter Zellen, Verwendung von Kollagen nach 3xNaOH, Kollagenkonzentration 1mg/ml; $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well, 24h Beobachtung, Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken, $p < 0,001$.

FKS-Variablen	0% Gel, 0% ÜS	0% Gel, 10% ÜS	10% Gel, 0% ÜS	10% Gel, 0% ÜS
Anzahl N Versuche	7	7	7	1
Anzahl n Einzelversuche	19	16	19	4
Area in %	59 ± 10	32 ± 6	46 ± 11	61 ± 2

Tabelle 19: Daten zu Abbildung 21, $p < 0,001$.

4.5 Finales Kollagen versus Rohkollagen

4.5.1 Probleme bei der Verwendung von Kollagen nach 3xNaOH

Bei der Aufreinigung des Rohkollagens durch Zugabe von NaOH (Ausfällung) und anschließender Zentrifugation entstand ein Pellet, dass sich nach anschließender Zugabe von

0,1% HAc nur unvollständig auflösen ließ. Konzentrationsbestimmungen im BCA, sowie im SDS-Page lieferten aufgrund der unvollständigen Auflösung falsch niedrige Ergebnisse (hier nicht dargestellt). Die möglichen Gründe für die fehlende Auflösung sind Teil der Diskussion. Zudem war die Aufreinigung des Kollagens mit einem hohen Zeit- und Personalaufwand verbunden. Hierfür mussten 6 zusätzliche Tage bis zum Endprodukt Kollagen nach 3xNaOH eingeplant werden. Bell et al. 1979 beschrieb, dass auch das „Rohkollagen“ verwendet werden kann - also Kollagen, das nach der Säureextraktion und nach der 1. Zentrifugation bzw. der Trennung von den unlöslichen Bestandteilen, entsteht. Rohkollagen wurde gegenüber Kollagen nach 1x Neutralisation und 3x Neutralisation im CGC getestet. Dabei wurde die Kontraktion von Positiv- und Negativkontrollen der jeweiligen Kollagen-Fractionen überprüft. Bedingungen: $4,5 \times 10^5$ nicht-aktivierte Zellen; Kollagenkonzentration 1mg/ml; 24h Beobachtung der Kontraktionsreaktion.

4.5.2 Vergleich zwischen Rohkollagen, Kollagen nach 1xNaOH, Kollagen nach 3xNaOH

Drei Kollagenfraktionen (Rohkollagen, 1x NaOH, 3x NaOH) wurden im CGC getestet. Bei Verwendung von Rohkollagen entstanden stabilere Gele, als mit Kollagen nach 1xNaOH bzw. 3xNaOH (siehe Abbildung 22).

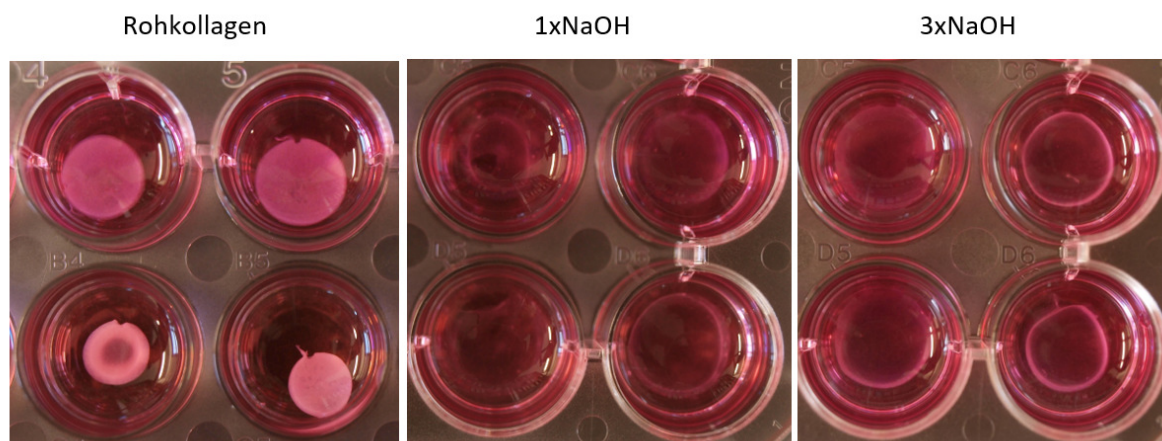


Abbildung 22: dünne Gelbildung bei Positiv- (obere Reihe) und Negativkontrollen (untere Reihe) mit Kollagen nach 1xNaOH und 3xNaOH.

Abbildung 23 zeigt anhand von Positiv- und Negativkontrollen den Vergleich zwischen den 3 Kollagenfraktionen. In jedem Fall konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrollen gezeigt werden. Prinzipiell können also alle 3 Kollagenfraktionen im CGC eingesetzt werden. Für die Auswahl einer geeigneten Kollagenfraktion wurde die Gelstabilität

bei der Herstellung beobachtet. Als Mindestmaß für die Kontraktion wurde eine Kontraktionsspanne von 20% zwischen Positiv- und Negativkontrolle festgelegt.

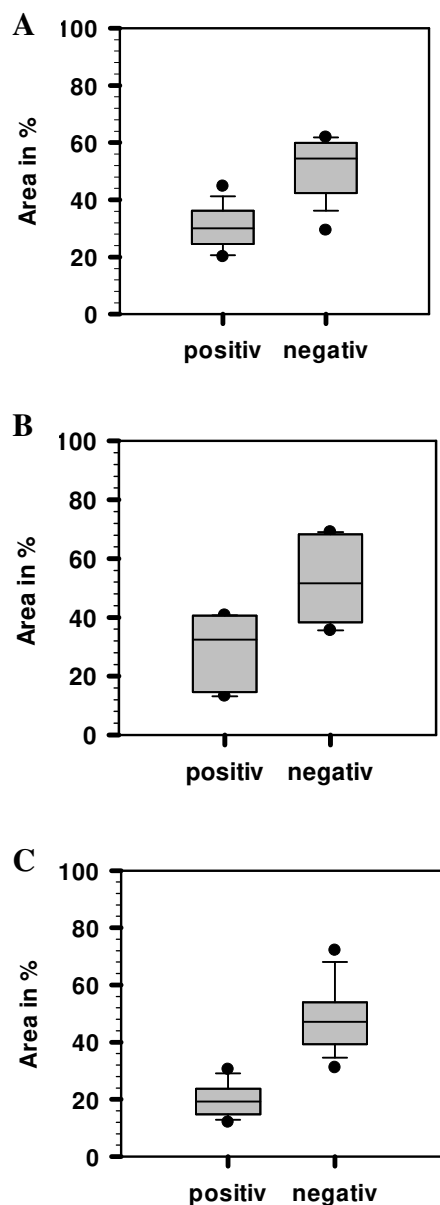


Abbildung 23: Auswertung der Positiv- und Negativkontrollen für Kollagen nach 3xNaOH (A), nach 1x NaOH (B) und Rohkollagen (C). Nicht aktivierte Zellen, 4,5e5 Zellen/Well, Kollagenkonzentration 1mg/ml. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken. 3xNaOH: $p < 0,001$, 1xNaOH: $p = 0,011$, Rohkollagen: $p < 0,001$.

	3xNaOH positiv	3xNaOH negativ	1xNaOH positiv	1xNaOH negativ	Rohkollagen positiv	Rohkollagen negativ
--	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	------------------------	------------------------

Anzahl N	16	16	6	6	36	36
Anzahl n Einzelversuche	54	54	6	6	97	107
Area in %	30,6 ± 7,1	51,0 ± 10,0	29,1 ± 12,2	52,5 ± 14,0	20 ± 5,9	48,3 ± 12,4

Tabelle 20: Daten zu Abbildung 23. $p < 0,001$.

Innerhalb der Versuchsreihe mit Kollagen nach 3xNaOH konnten 44% der Gele auf Grund eines instabilen Gels bei der Herstellung nicht ausgewertet werden. Innerhalb der noch auswertbaren Gele erreichten 75% die geforderte Kontraktionsspanne zwischen Positiv- und Negativkontrolle von $>20\%$. Beim Kollagen nach 1xNaOH war die Hälfte der Gele nicht auswertbar. Die Kontraktionsspanne von min. 20% wurde hier bei keinem der Gele erreicht. Unter Verwendung von Rohkollagen konnten stabile Gele hergestellt und somit alle Gele ausgewertet werden. Hier erreichten 83,5% die erforderliche Kontraktionsspanne. Auf Grund der Ersparnis von Zeit, Personal- und Materialkosten bei der Herstellung von Rohkollagen, sowie die gute Stabilität bei der Gelherstellung und guten Ergebnissen bei den Positiv- und Negativkontrollen entschieden wir uns für alle nachfolgenden Versuche für die Verwendung von Rohkollagen.

4.6 Etablierung des CGC unter Verwendung von Rohkollagen

Auf Grund der besseren Handhabung und besseren Kontraktionsergebnisse benutzten wir für alle weiteren Versuche Rohkollagen (siehe 3.2.1), sowie nicht aktivierte Zellen. Hierzu war es jedoch notwendig die verschiedenen Variablen zur Etablierung mit Rohkollagen erneut zu testen.

4.6.1 Zeitverlauf der Kontraktionsinduktion

Aus der Literatur war bekannt, dass bereits in den ersten 24h eine starke Kontraktion ausgelöst werden kann. In einem Versuchsansatz mit Doppelbestimmung für eine Positiv- bzw. eine Negativkontrolle wurde die Fläche des Gels über die Zeit gemessen. Es wurden $4,5 \times 10^5$ nicht aktivierte Zellen/Well und eine Kollagenkonzentration von 1mg/ml eingesetzt.

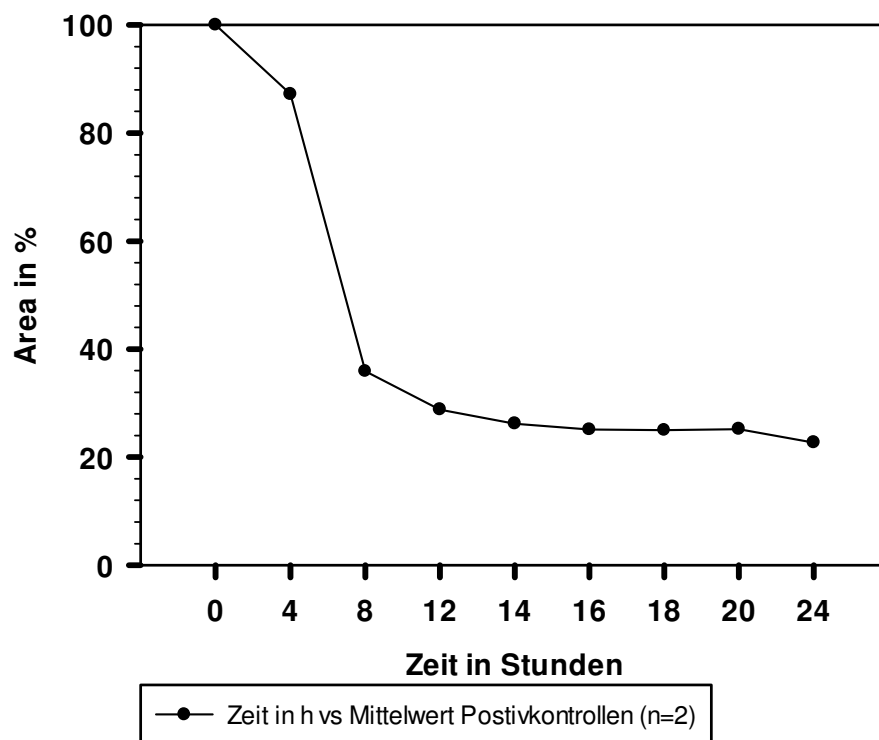


Abbildung 24: Zeitverlauf der Kontraktion über 24h, Darstellung der Positivkontrolle, Doppelbestimmung, Rohkollagen 1mg/ml, Verwendung von $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well.

Die größte Kontraktion findet innerhalb der ersten 12h statt (Kontraktion um 74% der Ausgangsfläche). Die Kontraktionsspanne zwischen Positiv- und Negativkontrolle blieb mit einem Faktor von 1,4 zwischen 12- und 24h nahezu unverändert (hier nicht bildlich dargestellt). Damit könnte die Zeit bis zur Flächenbestimmung von 24 auf 12h reduziert werden. Eine 24-stündige Beobachtung ließ sich für uns allerdings besser in den Arbeitsalltag integrieren.

4.6.2 Verwendung von aktivierten- und nicht aktivierten Zellen

Bei Kollagen nach $3 \times \text{NaOH}$ sahen wir bessere Kontraktionswerte mit nicht aktivierten Zellen. Für Rohkollagen erreichten wir bei den nicht aktivierten Zellen einen Kontraktionsfaktor von 2,8 zwischen der Positiv- und Negativkontrolle, für aktivierte Zellen 1,9. Bei $n=2$ für aktivierte Zellen erfolgte keine Statistik.

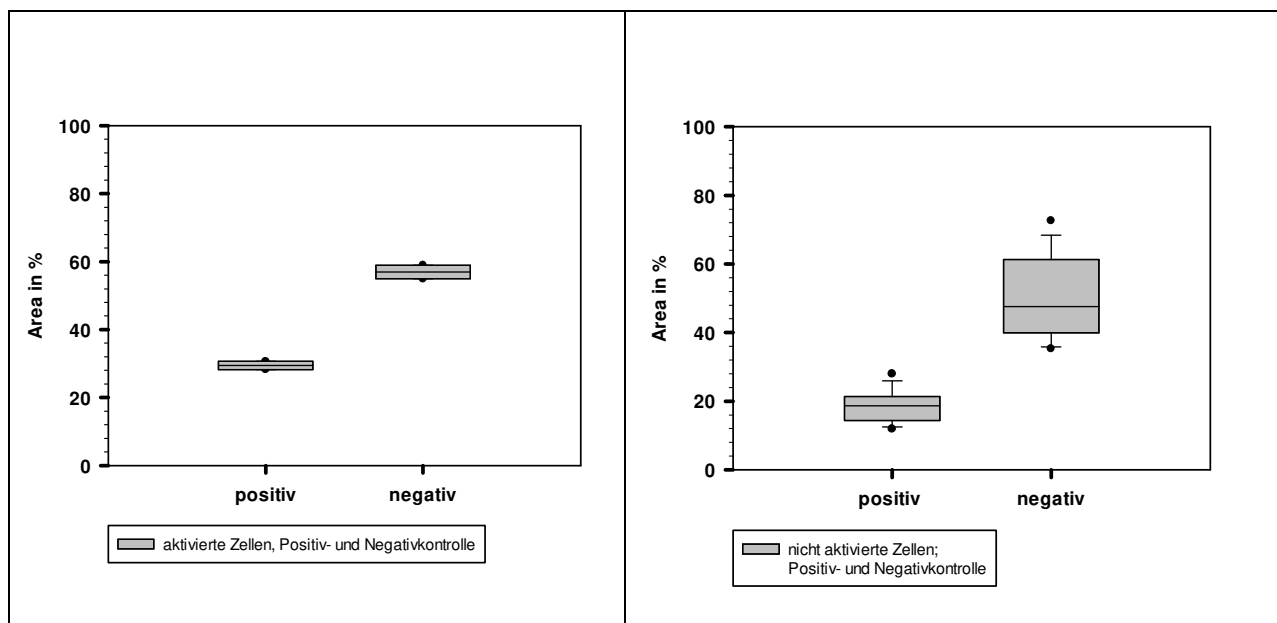


Abbildung 25: Vergleich der Kontraktionsstärke bei den Positiv- und Negativkontrollen. Links: aktivierte Zellen. Rechts: nicht-aktivierte Zellen. Verwendung von Rohkollagen 1mg/ml Zellzahl $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken, $p < 0,001$.

Variablen	Aktivierte Zellen	Aktivierte Zellen	Nicht aktivierte Zellen	Nicht aktivierte Zellen
	0%Gel 0%FKS	0%Gel 10%FKS	0%Gel 0%FKS	0%Gel 10%FKS
Anzahl N	1	1	26	26
Einzelversuche n	2	2	69	69
Area in % \pm SD	$56,9 \pm 2,8$	$29,4 \pm 1,7$	$50,3 \pm 12,3$	$18,5 \pm 5$
Kontraktionsfaktor positiv/negativ	1,9		2,8	

Tabelle 21: Daten zu Abbildung 25, $p < 0,001$.

4.6.3 Vergleich der Vorbehandlungszeit der nicht-aktivierten Zellen

Wir untersuchten die unterschiedliche Kontraktionskraft von Zellen, die 4 - bzw. 24h serumfrei gesetzt wurden. Nach 4h erreichten wir bereits eine Kontraktionsspanne zwischen Positiv- und Negativkontrolle von über 20%. Nach 24h zeigte sich keine weitere Steigerung, weshalb wir

im Verlauf weiterhin mit nicht aktivierten Zellen nach 4h serumfreier Vorbehandlung arbeiteten.

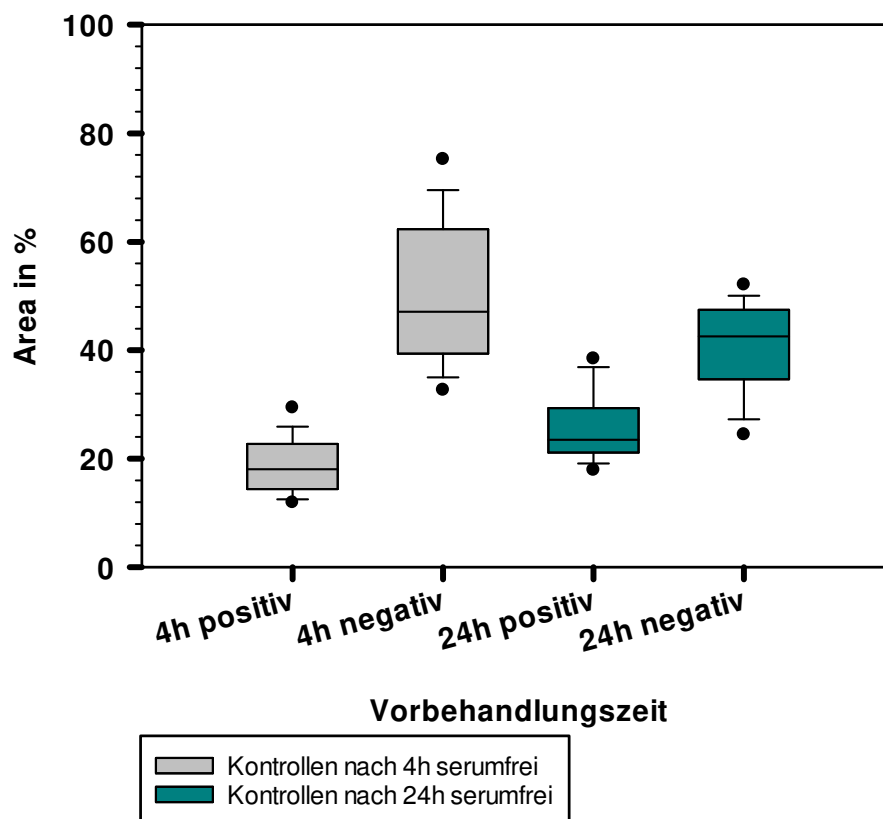


Abbildung 26: Vergleich Kontraktionsspanne von Fibroblasten nach 4- bzw. 24h serumfreier Vorbehandlung. Zellzahl $4,5 \times 10^5$ /Well, Rohkollagen 1mg/ml. 24h Beobachtung. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken, $p < 0,001$.

	4h positiv	4h negativ	24h positiv	24h negativ
Anzahl N	31	31	5	5
Anzahl n Einzel	79	85	16	18
Area in % \pm SD	$18,7 \pm 5,0$	$49,6 \pm 12,9$	$25,4 \pm 5,8$	$42,0 \pm 8,2$

Tabelle 22: Daten zu Abbildung 26, $p < 0,001$.

4.6.4 Verschiedene Zellzahlen vs. Kontraktionsstärke mit Rohkollagen

Analog zu 3.3.2 untersuchten wir die Kontraktionskraft anhand verschiedener Zellzahlen unter Verwendung von Rohkollagen. Wir verwendeten nicht aktivierte Zellen und eine Rohkollagenkonzentration von 1mg/ml. Bei den Positivkontrollen wurde in den Überstand 10%

FKS gegeben, die Negativkontrollen blieben ohne FKS im Überstand. Bei einer Zellzahl zwischen $1e^5$ /Well und $4,5e^5$ /Well erreichten wir bei $4,5e^5$ /Well mit $18,3\% \pm 4,8$ ($n=6$) für die Positivkontrolle und $46,3\% \pm 8,0$ ($n=6$) für die Negativkontrolle die höchste Kontraktionsspanne mit der geringsten Streuung. Bei $9,5e^5$ Zellen/Well erreichten wir nur eine Kontraktionsspanne zwischen Positiv- und Negativkontrolle von 23%. Zudem war die Kultivierung solch hoher Zellzahlen zeitlich und materiell sehr aufwendig.

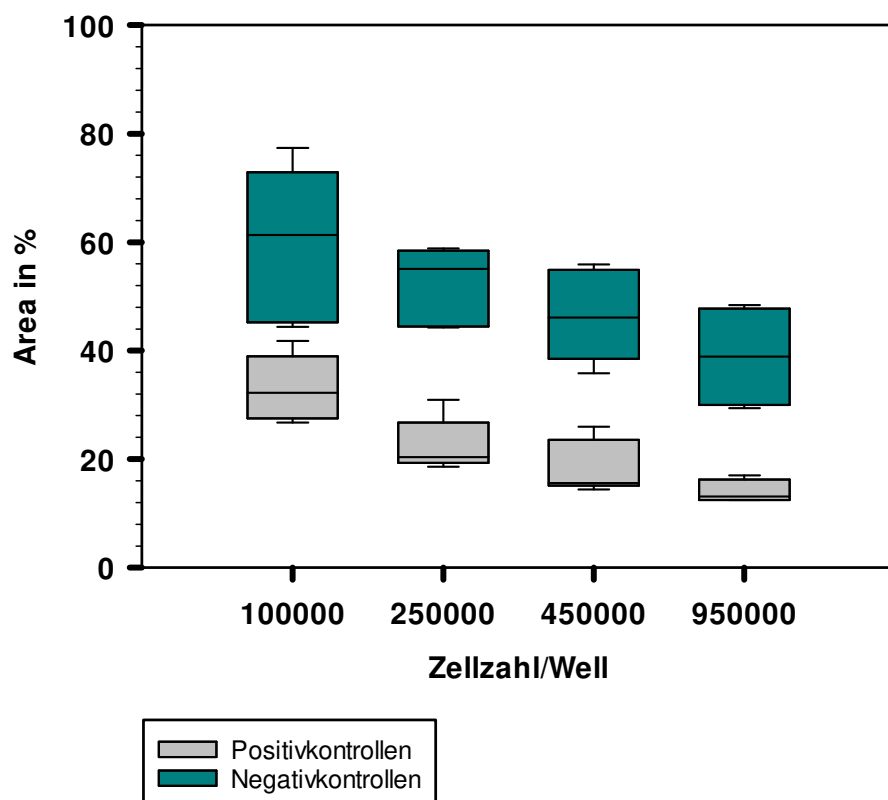


Abbildung 27: Vergleich der Kontraktionsstärke in Abhängigkeit der Zellzahl. Darstellung der Positiv (grau) – und Negativkontrollen (cyan). Unterschiedliche Zellzahlen von nicht aktivierten Zellen (Zellzahl $4,5e^5$ /Well) wurden in den CGC (Rohkollagen, 1mg/ml) eingesetzt. Die Restfläche (Area in %) wurde nach 24h bestimmt. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken, $p < 0,001$.

Zellzahl/Well	$1e^5$	$2,5e^5$	$4,5e^5$	$9,5e^5$
Anzahl N	3	3	3	3
Anzahl Einzelversuche n	5	5	6	4
Area in % \pm SD (positiv)	$33,0 \pm 6,1$	$22,5 \pm 5,0$	$18,3 \pm 4,8$	$13,9 \pm 2,1$
Area in % \pm SD (negativ)	$59,5 \pm 14,3$	$52,2 \pm 7,2$	$46,3 \pm 8,0$	$38,9 \pm 9,7$

Kontraktionsfaktor negativ/positiv	1,8	2,4	2,7	2,9
---------------------------------------	-----	-----	-----	-----

Tabelle 23: Daten zu Abbildung 27.

4.6.5 Kollagenkonzentration vs. Kontraktionsstärke mit Rohkollagen

Wie schon bei der Verwendung von Kollagen nach 3xNaOH sahen wir bei Rohkollagen die höchste Kontraktionsspanne zwischen Positiv- und Negativkontrolle von 27% bzw. einen Faktor von 2,8. (Abbildung 28).

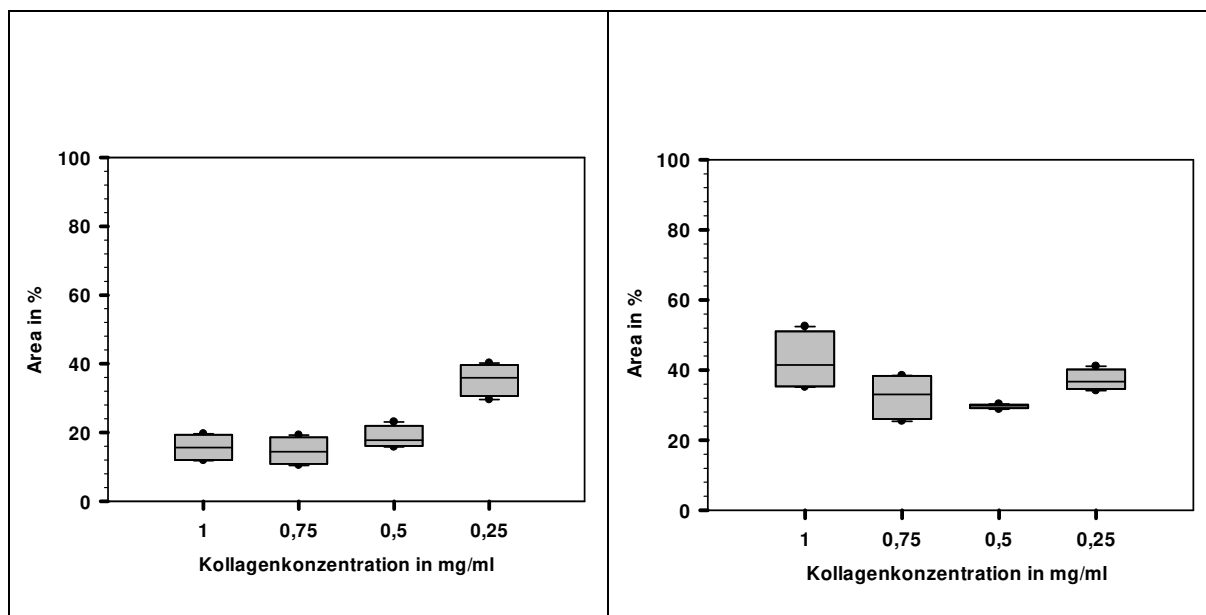


Abbildung 28: Vergleich der Kontraktionsstärke in Abhängigkeit der Kollagenkonzentration. Unterschiedliche Kollagenkonzentrationen (Rohkollagen) wurden hergestellt und nicht aktivierte Zellen ($4,5 \times 10^5$ /Well) zugesetzt. 24h Beobachtung. Links = Positivkontrolle, rechts = Negativkontrolle. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95-Perzentile als Fehlerbalken. p (positiv) $< 0,001$, p (negativ) = 0,034.

Kollagenkonzentration	1 mg/ml	0,75 mg/ml	0,5 mg/ml	0,25 mg/ml
Anzahl N	2	2	2	2
Anzahl Einzelversuche n	4	4	4	4
Area in % \pm SD (positiv)	15,6 \pm 4,1	14,6 \pm 4,0	18,6 \pm 3,2	35,4 \pm 4,7
Area in % \pm SD (negativ)	42,6 \pm 8,5	32,5 \pm 6,7	29,7 \pm 0,6	37,2 \pm 2,9
Kontraktionsfaktor neg/pos.	2,8	2,3	1,6	1,1

Tabelle 24: Daten zu Abbildung 28.

4.6.6 Überprüfung der FKS-Variablen im Kontraktions-Assay

Wie bei Kollagen nach 3xNaOH bestätigte sich das Ergebnis, dass zur Unterscheidung der Positiv- von der Negativkontrolle die Zugabe von 10% in den Überstand notwendig ist.

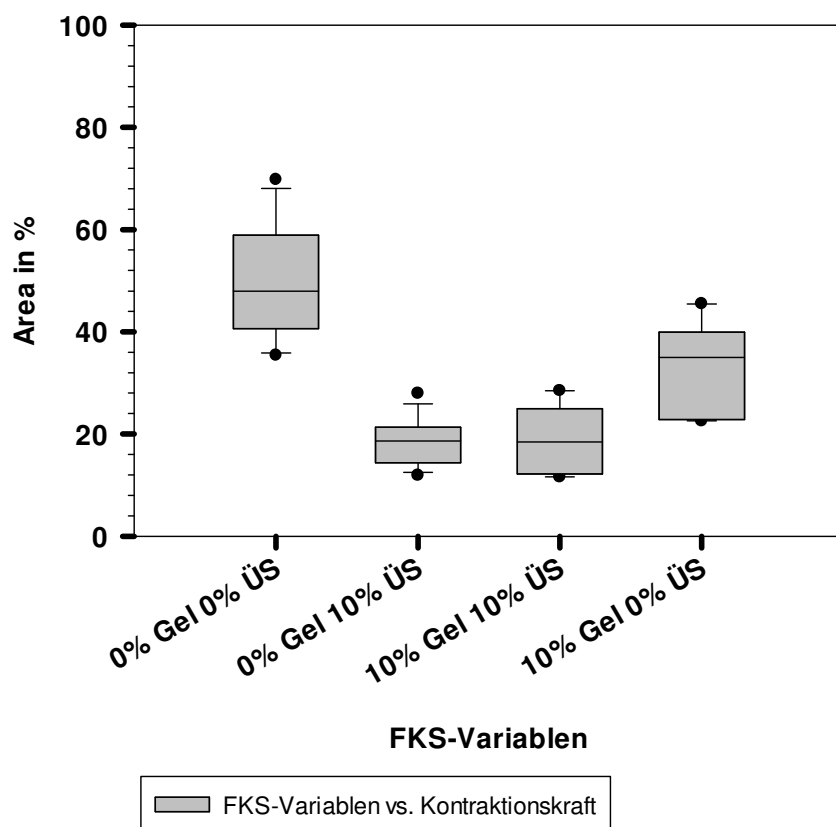


Abbildung 29: Vergleich verschiedener FKS-Variablen auf die Kontraktionskraft nicht-aktivierter Zellen, Rohkollagen 1mg/ml; $4,5 \times 10^5$ Zellen/Well, 24h Beobachtung, Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken, $p < 0,001$.

FKS-Variablen	0% Gel, 0% ÜS	0% Gel, 10% ÜS	10% Gel, 10% ÜS	10% Gel, 0% ÜS
Anzahl N Versuche	36	36	5	5
Anzahl Einzelversuche	79	69	10	10
Area in % \pm SD	50,5 \pm 11,7	18,5 \pm 5,0	18,9 \pm 6,7	33,6 \pm 8,6

Tabelle 25: Daten zu Abbildung 29. $p < 0,001$.

4.7 Zusammenfassung zur Etablierung eines CGC

Zusammenfassend ließ sich für die Etablierung des CGC folgendes ableiten:

1. Für eine maximale Kontraktionshemmung musste eine Vorbehandlung der Zellen mit serumfreien DMEM zur Reduktion des Zellstoffwechsels erfolgen. „Nicht-aktivierte Zellen“ lieferten die größte Kontraktionskraft. Eine Vorbehandlung von 4h war dabei ausreichend.
2. Um eine optimale Kontraktionsspannweite zu erzielen, musste in der Gelherstellung FKS-frei gearbeitet werden.
3. Für die Negativkontrolle (keine bzw. minimale Kontraktion) durfte in den Überstand lediglich 500µl DMEM und kein FKS hinzugegeben werden.
4. Für die Positivkontrolle (Kontraktion) muss in den Überstand zusätzlich 50µl FKS hinzugegeben werden.
5. Ein großes Problem bei den Versuchen mit Kollagen nach 3xNaOH war die genaue Bestimmung der Kollagenkonzentration. Nach der Herstellung lag nur selten eine homogene Kollagenlösung vor. Häufig waren größere Gelaggregate nachweisbar, die nicht für den CGC verwendet werden konnten.
6. Durch die Verwendung von Rohkollagen waren die Versuche insgesamt zeitsparender und es wurden insgesamt reproduzierbarere Ergebnisse erzielt.
7. Ein Beobachtungszeitraum von 8-12h ist ausreichend – für den Laboralltag sind jedoch 24h besser geeignet.

4.8 Anwendung des CGC

Zur Untersuchung der RTK-I Dasatinib, Nilotinib und Imatinib wurden zunächst geeignete Positiv- und Negativkontrollen benötigt. Der Unterschied zwischen der Positiv- und Negativkontrolle, also maximale Kontraktion und wenig Kontraktion, musste möglichst groß sein (min. 20%), um einen Effekt der Medikamente beobachten zu können (siehe 4.4.4). Für den CGC benutzten wir Rohkollagen aus der Präparation vom 12.12.16 sowie nicht aktivierte Fibroblasten in der Passage p4-p8 (nach 4h FKS-freier Vorbehandlung) aus rechten Rattenlungen der Kultur 518. Zum Protokoll des Medikamentenversuchs mit dem CGC siehe 3.4. Nach 24h wurde das Ergebnis mit einer Kamera Olympus E-450 fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ und SigmaPlot13 (siehe 2.5). Zur Überprüfung der Zellvitalität, fertigten wir zusätzlich eine Fluoreszenzfärbung mit Dabi und Calcein an (2.4.2).

4.8.1 Imatinib

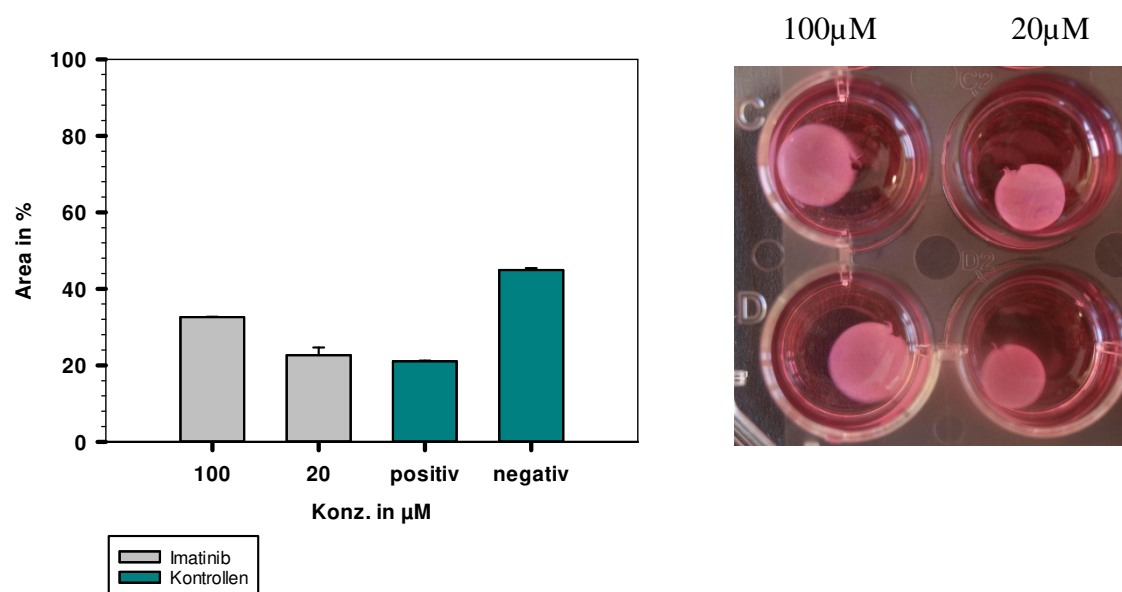


Abbildung 30: Vergleich der Kontraktionshemmung Imatinib vs. Kontrollen im CGC (Einzelversuch mit Doppelbestimmung): Konzentration Imatinib 100µM bzw. 20µM. Verwendung von Rohkollagen 1mg/ml. Zellzahl $4,5 \times 10^5$ /Well. Links: Boxplot, rechts: bildliche Darstellung des Versuchs mit je einer Doppelbestimmung.

Konzentration Imatinib	100µM	20µM	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Anzahl N Versuche	1	1	1	1
Anzahl Einzelversuche n	2	2	2	2
Area in % ± SD	32,6 ± 0,1	22,7 ± 1,4	21,1 ± 0,1	44,9 ± 0,4

Tabelle 26: Daten zu Abbildung 30. Keine Statistik bei n=2.

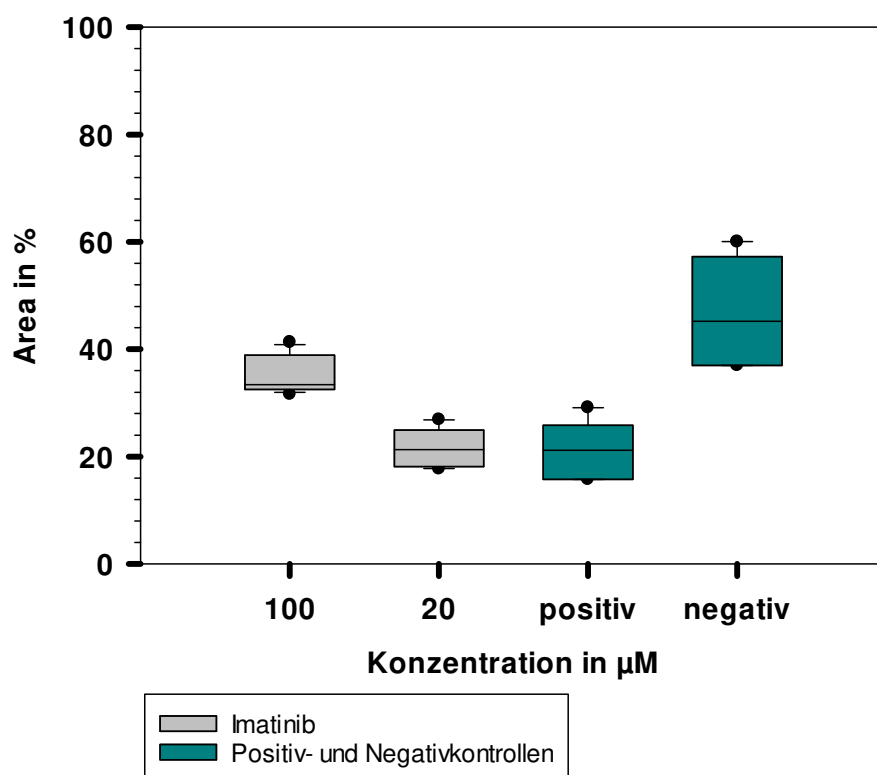


Abbildung 31: CGC Imatinib vs. Positiv- und Negativkontrollen: Imatinib 100 μ M n= 13, Imatinib 20 μ M n= 13, Positivkontrolle n= 7, Negativkontrolle n= 7. Verwendung von nicht aktivierten Fibroblasten nach 4h serumfreier Vorbehandlung mit 0% FKS (Zellzahl 4,5e⁵/Well). Alle Gele mit 0% FKS im Gel. Im Überstand der CGC DMEM + 10% FKS, 30 min Vorinkubation mit Imatinib. Positivkontrollen: 0% FKS im Gel + 10% FKS im ÜS, Negativkontrollen: 0% FKS im Gel + 0% FKS im ÜS, Rohkollagen 1mg/ml. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken. Die Werte bei einer Konzentration unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Positivkontrolle (p=1,0). Die übrigen Werte sind signifikant zueinander (p< 0,001).

Konzentration	100 μ M	20 μ M	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Imatinib				
Anzahl N Versuche	5	5	5	5
Anzahl Einzelversuche n	13	13	7	7
Area in % \pm SD	35,2 \pm 3,5	22,0 \pm 3,5	21,5 \pm 4,8	48,3 \pm 9,8

Tabelle 27: Daten zu Abbildung 31.

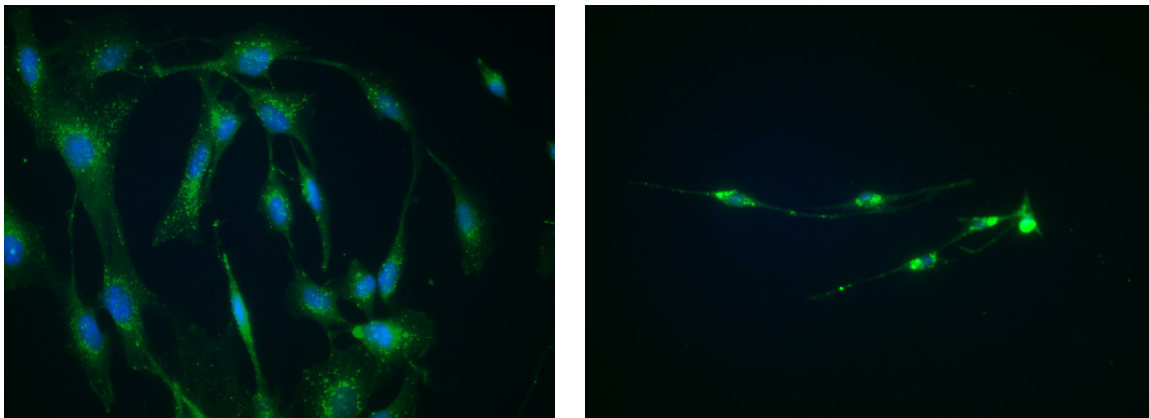


Abbildung 32: Fluoreszenzfärbung mit Dapi und Calcein zur Vitalitätsprüfung, 20x Vergrößerung, links: Kontrolle mit 0,1% DMSO nach 24h (20x Vergrößerung), rechts: Imatinib 100μM nach 24h (20x Vergrößerung).

Sowohl bei einer Konzentration von 20μM, als auch mit 100μM konnten wir keine Hemmung beobachten. Dabei entsprach das Ausmaß der Kontraktion dem der Positivkontrolle (Abbildung 31). Am ehesten spielt hier der zytotoxische Effekt von Imatinib eine entscheidende Rolle für das Kontraktionsverhalten. Nach 24h Inkubation mit 100μM sind nur noch wenige Zellen vital (siehe Abbildung 32).

4.8.2 Nilotinib

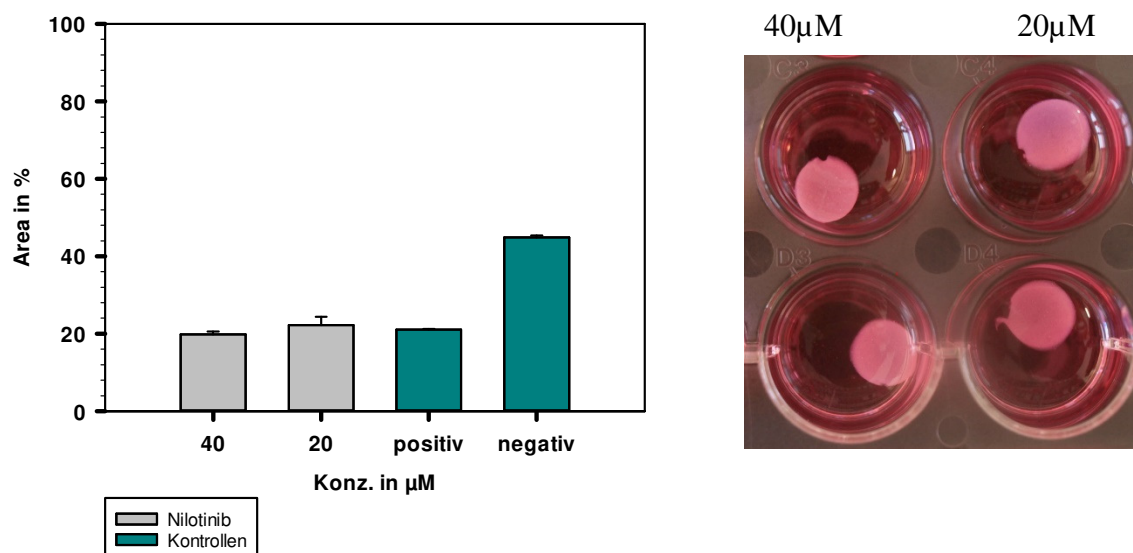


Abbildung 33: Vergleich der Kontraktionshemmung Nilotinib vs. Kontrollen im CGC (Einzelversuch mit Doppelbestimmung): Konzentration Nilotinib 40μM bzw. 20μM. Verwendung von Rohkollagen 1mg/ml. Zellzahl $4,5 \times 10^5$ /Well. Links: Boxplot, rechts: bildliche Darstellung des Versuchs mit je einer Doppelbestimmung.

Konzentration Nilotinib	40 μ M	20 μ M	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Anzahl N Versuche	1	1	1	1
Anzahl Einzelversuche	2	2	2	2
Area in % \pm SD	19,8 \pm 0,5	22,2 \pm 1,5	21,1 \pm 0,1	44,9 \pm 0,4

Tabelle 28: Daten zu Abbildung 33. Keine Statistik bei n=2.

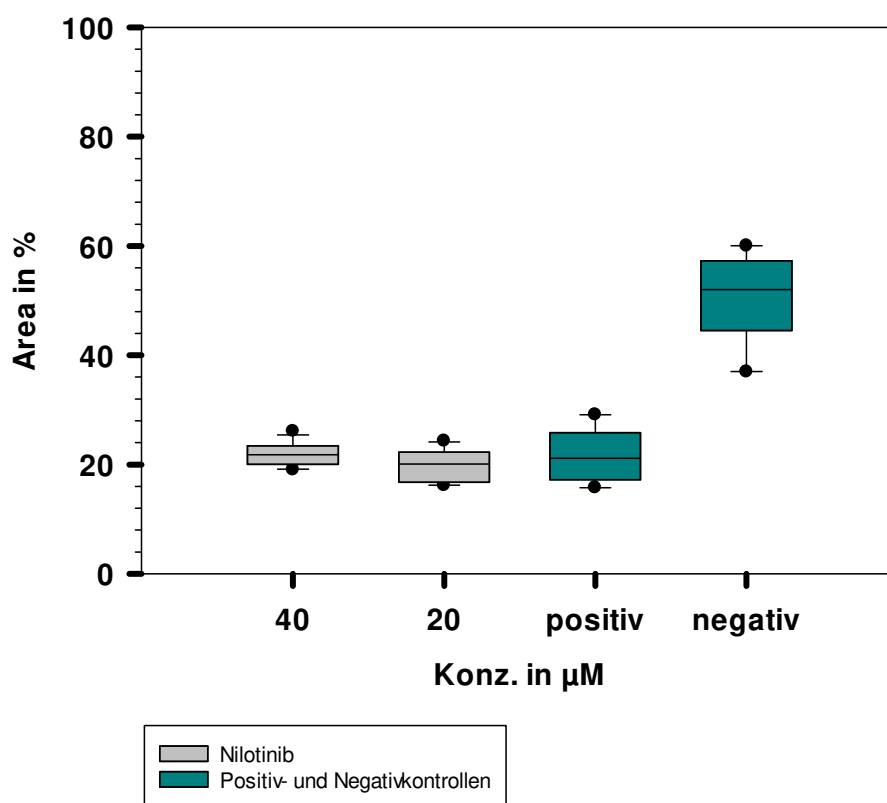


Abbildung 34: CGC Nilotinib vs. Positiv- und Negativkontrollen: Nilotinib 40 μ M n=13, Nilotinib 20 μ M n=13, Positivkontrolle n=7, Negativkontrolle n=7. Verwendung von nicht aktivierten Fibroblasten nach 4h serumfreier Vorbehandlung mit 0% FKS (Zellzahl $4,5 \times 10^5$ /Well). Alle Gele mit 0% FKS im Gel. Im Überstand der CGC DMEM + 10% FKS, 30 min Vorinkubation mit Nilotinib. Positivkontrollen: 0% FKS im Gel + 10% FKS im ÜS, Negativkontrollen: 0% FKS im Gel + 0% FKS im ÜS, Rohkollagen 1mg/ml. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken. Die Positiv- und Negativkontrollen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$), keine Signifianz besteht zwischen den 2 Konzentrationen von Nilotinib ($p=1,000$).

Konzentration Nilotinib	40µM	20µM	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Anzahl N Versuche	5	5	5	5
Anzahl Einzelversuche	13	13	7	7
Area in % ± SD	21,8 ± 2,1	19,8 ± 2,9	21,7 ± 4,6	50,5 ± 8,5

Tabelle 29: Daten zu Abbildung 34.

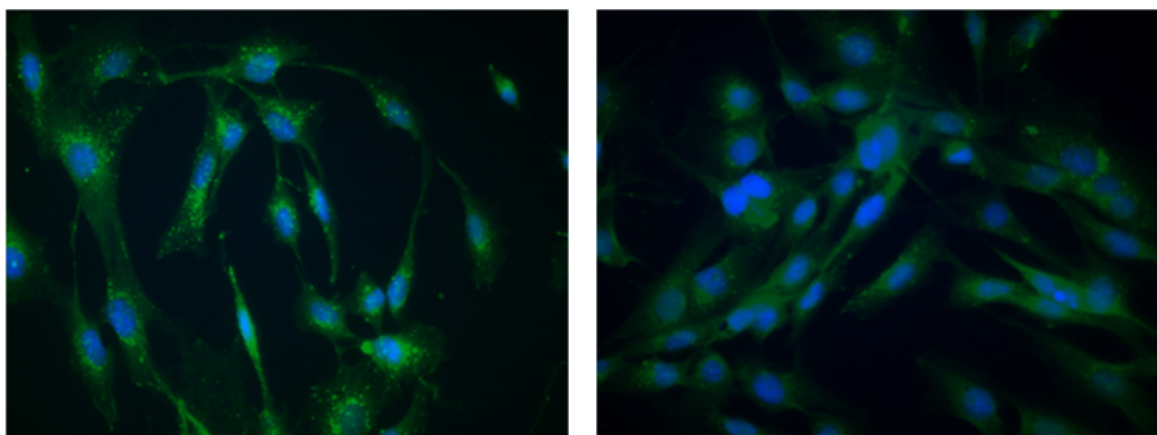


Abbildung 35: Fluoreszenzfärbung mit Dapi und Calcein zur Vitalitätsprüfung, 20xVergrößerung, links: Kontrolle mit 0,1% DMSO nach 24h, rechts: Nilotinib 40µM nach 24h.

Bei Nilotinib war keine Hemmung bzw. ein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen zu erkennen. Allerdings waren die Zellen im Gegensatz zum Imatinib nach 24h noch vital.

4.8.3 Dasatanib

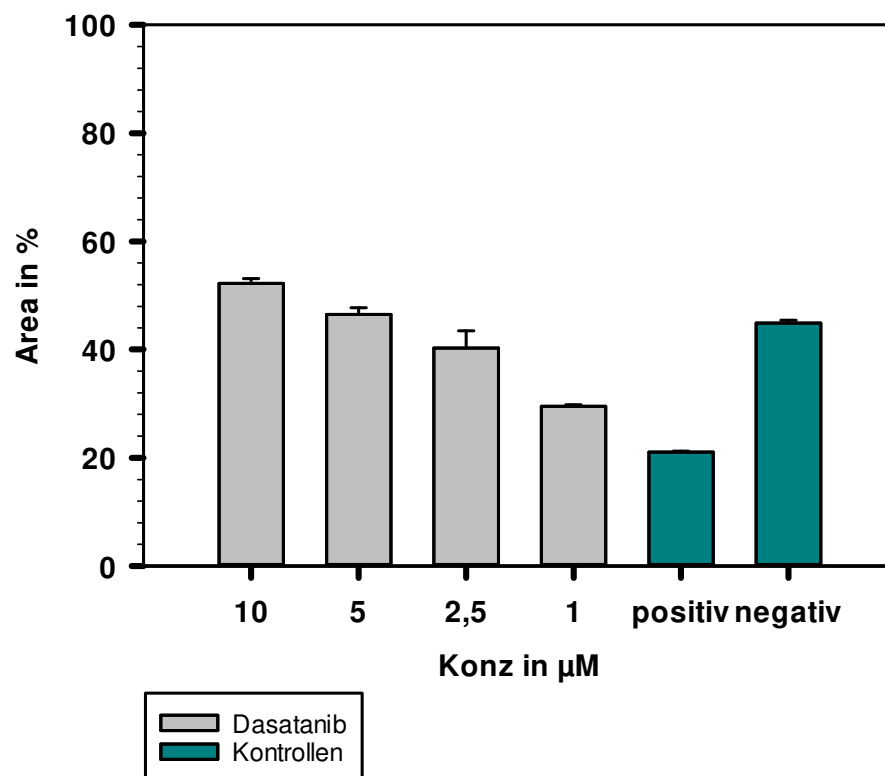


Abbildung 36: Vergleich der Kontraktionshemmung Dasatanib vs. Kontrollen im CGC (Einzelversuch mit Doppelbestimmung): Konzentration Dasatanib 10µM, 5µM, 2.5µM und 1µM. Verwendung von Rohkollagen 1mg/ml. Zellzahl $4,5e^5$ /Well.

Konzentration	10µM	5µM	2,5µM	1µM	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Dasatanib						
Anzahl N	1	1	1	1	1	1
Versuche						
Anzahl n	2	2	2	2	2	2
Einzelversuche						
Area in % ± SD	52,3 ± 0,6	46,5 ± 0,9	40,3 ± 2,3	29,5 ± 0,2	21,1 ± 0,1	44,9 ± 0,4

Tabelle 30: Daten zu Abbildung 36. Keine Statistik bei n=2.

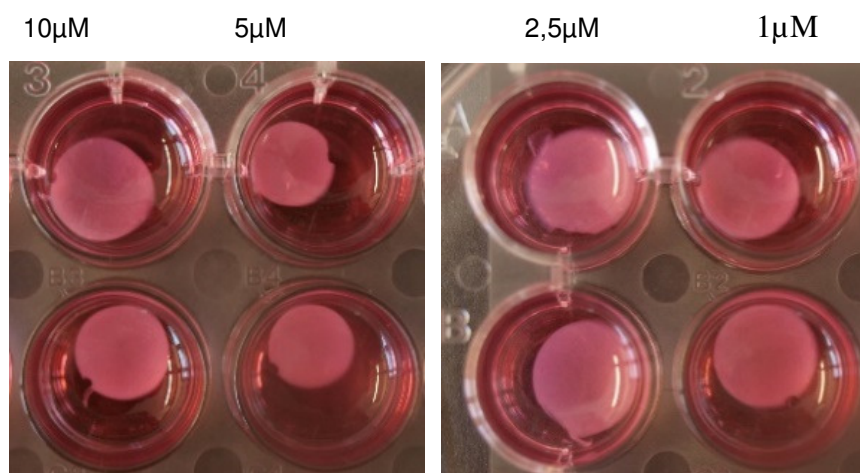


Abbildung 37: Darstellung des CGC zu Abbildung 36. Konzentration Dasatanib absteigend mit je einer Doppelbestimmung.

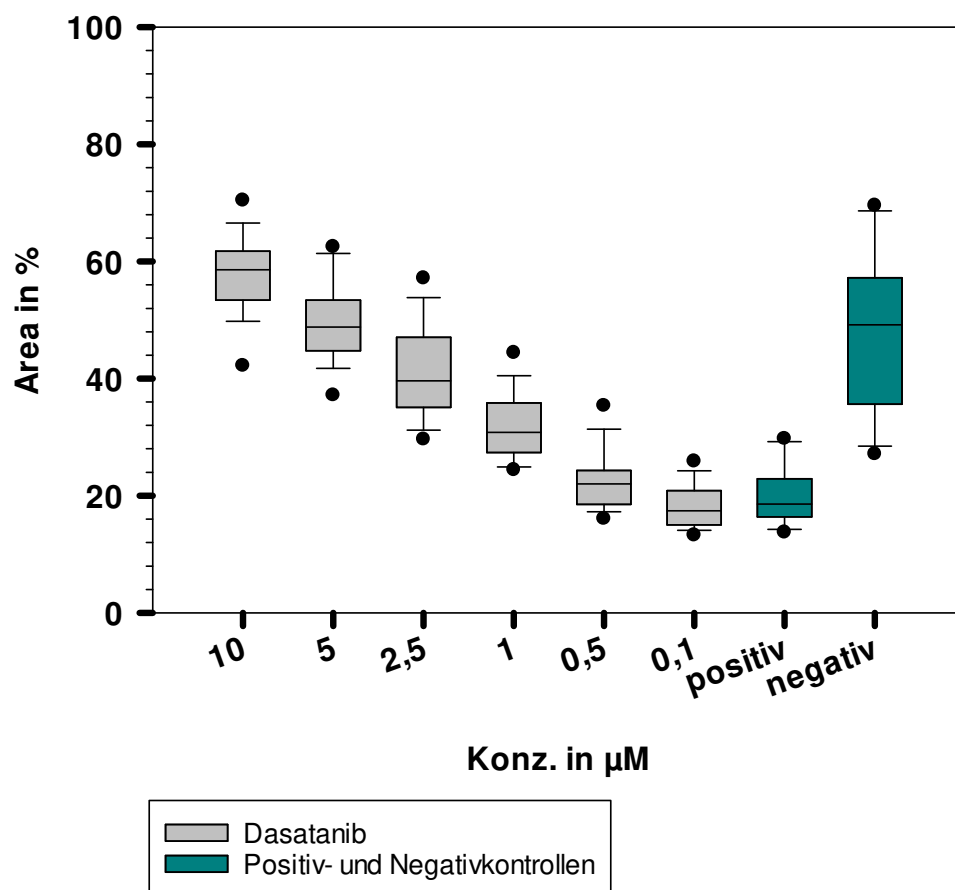


Abbildung 38: CGC Dasatanib vs. Positiv- und Negativkontrollen: Dasatanib 10 μM n=27, Dasatanib 5 μM n= 27, Dasatanib 2,5 μM n=27, Dasatanib 1 μM n= 27, Dasatanib 0,5 μM n= 23, Dasatanib 0,1 μM n= 23, Positivkontrolle n=17, Negativkontrolle n=17. Verwendung von nicht aktivierten Fibroblasten nach 4h serumfreier Vorbehandlung mit 0% FKS (Zellzahl 4,5e⁵/Well). Alle Gele mit 0% FKS im Gel, im Überstand des CGC DMEM + 10% FKS, 30

min Vorinkubation mit Dasatanib, Positivkontrollen: 0% FKS im Gel + 10% FKS im ÜS, Negativkontrollen: 0% FKS im Gel + 0% FKS im ÜS, Rohkollagen 1mg/ml. Boxplot mit Median (schwarze Linie), 25/75-Perzentilen (Balken), sowie die 5./95.Perzentile als Fehlerbalken. Die Ergebnisse der verschiedenen Konzentrationen und der Vergleich zu den Kontrollen sind statistisch signifikant zueinander, $p < 0,001$.

Konzentration Dasatanib in μM	10	5	2,5	1	0,5	0,1	Positivko ntrolle	Negativk ontrolle
Anzahl N Versuche	10	10	10	10	10	10	10	10
Anzahl n Einzelversuche	27	27	27	27	23	23	17	17
Area in % \pm SD	58,1 \pm 6,8	49,9 \pm 7,1	41,5 \pm 8,0	32,0 \pm 5,6	22,2 \pm 5,0	18,2 \pm 3,6	20,0 \pm 4,8	47,6 \pm 12,8

Tabelle 31: Daten zu Abbildung 38.

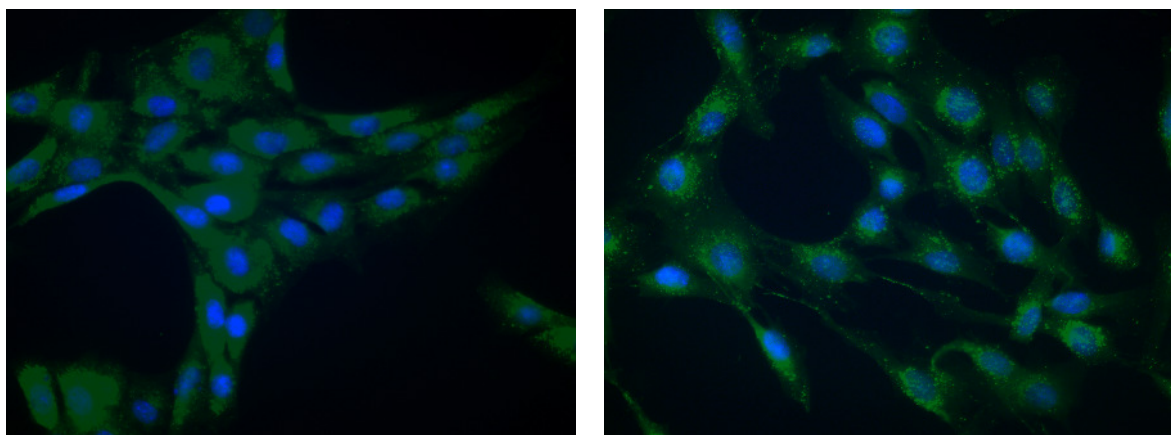


Abbildung 39: Fluoreszenzfärbung mit Dapi und Calcein zur Vitalitätsprüfung, 40x Vergrößerung. Links: Kontrolle mit 0,1% DMSO nach 24h. Rechts: 10 μM Dasatanib nach 24h.

In Abbildung 39 ist zu erkennen, dass die Zellen auch nach 24h stoffwechselaktiv waren. Somit führten wir die Hemmung der Kontraktion auf die Wirkung des Medikaments zurück. Die maximale Hemmung wurde bei einer Konzentration von 10 μM erreicht (Abbildung 38).

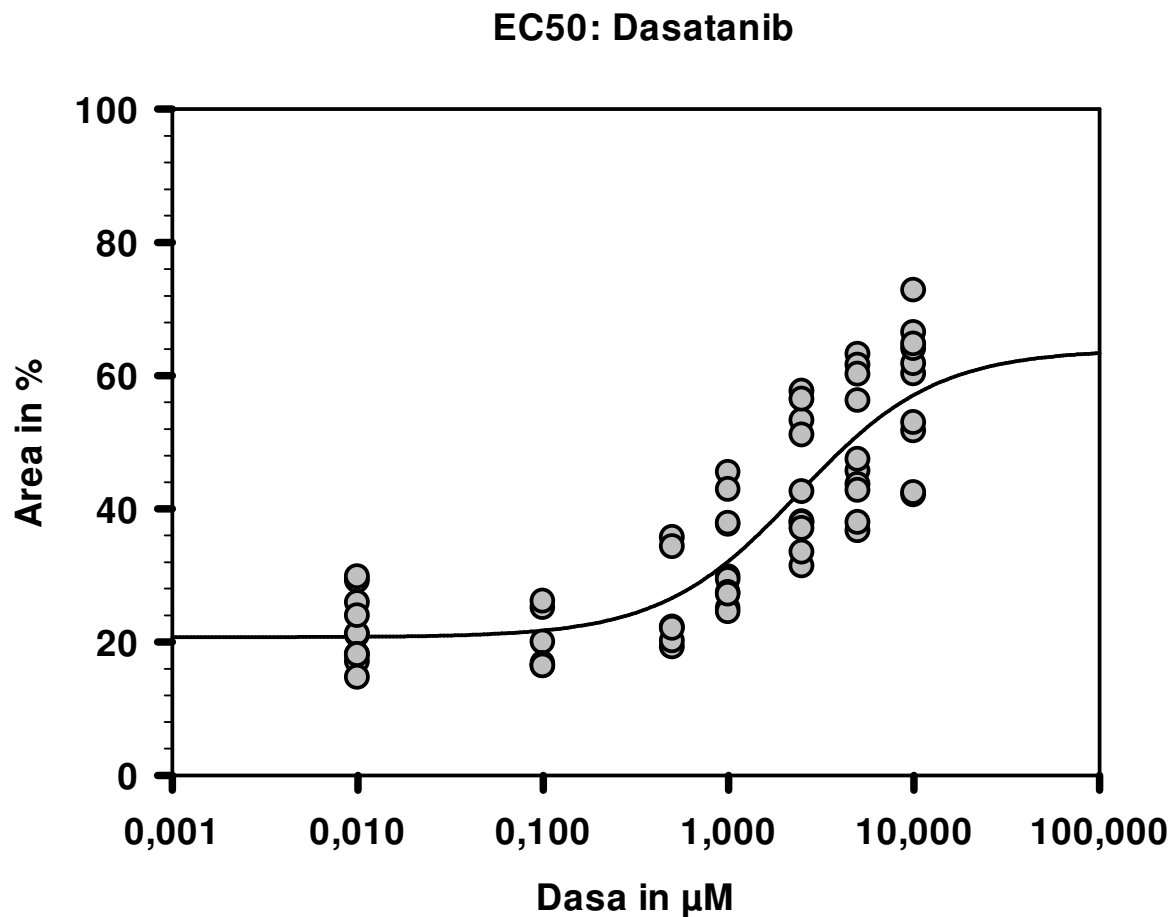


Abbildung 40: EC₅₀-Kurve Dasatanib: zusammengefasst aus 4 unabhängigen Versuchen, $p < 0,0001$, EC₅₀ = 2,4 μM .

Die mittlere Hemmkonzentration (EC₅₀-Wert) vom Dasatanib lag bei 2,4 μM . Hierzu wurden alle Einzelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen zusammengefasst und logarithmisch dargestellt (Abbildung 40). Für die Konzentration von 0,01 μM wurden die Werte der Positivkontrolle zugrunde gelegt.

5 Diskussion

5.1 Kollagenpräparation und Konzentrationsbestimmung

In der vorliegenden Studie wurde Kollagen aus Rattenschwanzsehnen gewonnen. Allerdings war das scheinbar einfache Herstellungs- und Reinigungsverfahren doch mit erheblichen Problemen behaftet. Technische Probleme umfassten die Proteindenaturierung durch hohe Scherkräfte und Temperaturschwankungen, die schlechte Renaturierbarkeit des ausgefällten Kollagens mit NaOH bei der Proteinaufreinigung und die Quantifizierung mittels herkömmlichen Proteinbestimmungssassay (BCA-Test).

Aufgrund der in unserem Labor durchgeführten Lungentransplantationen in der Ratte (von Suesskind et al. 2012) war es einfach möglich, Rattenschwänze für die Präparation von Kollagen-Typ-1 zu bekommen. Auch das Freilegen der Sehnen war unkompliziert. Die Isolierung des Kollagens mittels 0,1% HAc wurde bereits 1958 von Ehrmann et al gezeigt und ist bis heute eine gängige Methode, die auch von nachfolgenden Wissenschaftlern, wie Bornstein und Bell et al. verwendet wurde (Bell et al. 1979; García-Gareta 2014). Über die Säureextraktion werden zunächst die intramolekularen kovalenten Bindungen der Tripelhelix gelöst. Durch Neutralisation mit 1M NaOH erfolgt die erneute gerichtete Aneinanderreihung der Alpha-Ketten, wodurch parallele Fasern gebildet werden (Durand und Favard 1970). Letztendlich ist die Wiedererlangung der nativen Quartärstruktur wichtig für die Funktionsfähigkeit des Kollagens im CGC. Die Säureextraktion findet unter Rühren mit einem Magnetrührer statt. Dabei führt ein zu starkes Rühren über hohe Scherkräfte zu einer Trübung der Lösung, was einem Denaturierungsprozess gleichkommt (siehe Abbildung 41). Weder durch die zusätzliche Gabe von HAc, noch durch Erwärmung konnte dieser Niederschlag in Lösung gebracht werden.



Abbildung 41: rechts denaturiertes Kollagen durch zu kräftiges Rühren in der Kühlkammer

Um eine Denaturierung zu vermeiden ist stets auf eine niedrige Temperatur, sowie einen niedrigen pH-Wert (pH=4) zu achten (Banga 2004). Ein Temperaturanstieg führt zu einer schlechteren Löslichkeit des Kollagens aus dem Sehnenmaterial (Miller und Rhodes; GROSS und KIRK 1958). Weiterhin muss auch auf eine langsame Bewegung zur Vermeidung einer Proteindenaturierung geachtet werden (Rittié 2017; Bai et al. 2012). Um denaturiertes Protein aus unserer Lösung zu entfernen, zentrifugierten wir die Lösung. Dieser Prozess ist ohnehin notwendig, um unlösliche Bestandteile von der Kollagenlösung zu trennen. Das denaturierte Kollagen setzte sich als netzartige weiße Haut an der Oberfläche ab. Schließlich konnten wir zeigen, dass sich das Kollagen auch ohne Rühren aus den Sehnenfasern mit genügend Zeit (48-72h) herauslösen lässt (hier nicht dargestellt). Optimal war eine Inkubationszeit von 48 h bei 4°C unter leichtem Rühren. Vergleichbar zum Vorgehen von Rittié 2017. In der Literatur gibt es verschiedene Protokolle um „Rohkollagen“ aufzureinigen (Rittié 2017; Bell et al. 1979). Rittié (2017) führte eine Salzfällung mit anschließender Dialyse durch. Dabei entsteht ein lyophilisiertes Kollagenpellet, welches bei Bedarf in 18mM Essigsäure mit einer Zielkonzentration von 1,2mg/ml aufgelöst wird. In unserer Studie wendeten wir die Reinigungsschritte von Bell et al an, um möglichst reines Kollagen für den CGC zu erhalten (Bell et al. 1979). Das Ausfällen erfolgte über die vorsichtige Neutralisation durch NaOH. Eine anschließende Ansäuerung mit 0,1% HAc sollte dann das Kollagen wieder in Lösung bringen. Durch die Wiederholung dieses Prozederes sollten Verunreinigungen entfernt werden. Ein großes Problem bei diesem Reinigungsvorgang war jedoch, dass die Neutralisation nicht zu einem kompakten Pellet führte, sondern sich i. d. R. eine schleimige, klumpige Masse, deren Überstand nicht vollständig abgesaugt werden konnte, bildete. Zudem konnte dieses Pellet durch eine Ansäuerung nicht komplett gelöst werden. Es waren i. d. R. immer „Klumpen“ vorhanden. Diese Beobachtungen schließen eigentlich einen Reinigungseffekt aus und lassen auf Proteinverluste hindeuten. Nach dem letzten Reinigungsschritt war es schwierig, die Kollagenkonzentration im löslichen Teil zu bestimmen, da häufig noch unlösliche Kollagenaggregate vorhanden waren. Einige Gründe für die beschriebenen Probleme seien kurz diskutiert:

Bei der Neutralisation musste ein pH von 7-8 erreicht werden (Bell et al. 1979). Bei unzureichender NaOH-Zugabe war der pH-Wert häufig zu niedrig, um die gesamte Menge an vorhandenem Kollagen auszufällen, was einem quantitativen Kollagenverlust gleichkommen würde. In den Überständen war in unserer Studie kein Kollagen nachweisbar - somit sollte die Fällung immer funktioniert haben. Bei einem pH-Wert > 8 hatten wir Probleme, ausgefälltes Kollagen durch Zugabe von 0,1% HAc wieder in Lösung zu bringen. Durch unzureichende -

bzw. zu kurze Zentrifugation nach der Neutralisation kam es ebenfalls zu einem Proteinverlust. Dabei setzte sich das Pellet nicht richtig ab und der verbleibende Überstand war nur teilweise abnehmbar. Auch hier war kein gelöstes Kollagen im Überstand nachweisbar (SDS-Page und Coomassie-Färbung, Daten hier nicht gezeigt). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch dieses Verfahren die Tertiär- und Quartärstruktur des Kollagenmoleküls nicht wiederhergestellt werden kann. Dabei stellt insbesondere die Renaturierung nach der NaOH-Fällung die größte Herausforderung dar (unvollständige Auflösung des Kollagenpellets durch 0,1% HAc). Auch hier war eine Temperaturerhöhung eher kontraproduktiv. Die Zugabe von HAc war nur in Kombination mit niedrigen Temperaturen und längerer Inkubationszeit erfolgreich. Hauptproblem war die Klumpenbildung in der Kollagenlösung. Damit war auch die Bestimmung der Kollagenkonzentration ein kritischer Punkt bei der Kollagenpräparation. Der verwendete BCA-Test beruht darauf, dass Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan sowie Peptidbindungen unter geeigneten Bedingungen Cu^{2+} zu Cu^{+} reduzieren. Cu^{+} bildet mit Bicinchoninsäure einen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm. Normalerweise verwendet man Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin) als Referenzprotein. Beim Vergleich der Ergebnisse von BSA in HAc mit einer Kollagenreinsubstanz (Coll_R, bekannte Konzentration), lagen die Absorptionswerte (OD, optische Dichte) für BSA um Faktor 4 höher, als für Coll_R. Somit schied BSA als Referenzprotein aus (Abbildung 9; Abbildung 10). Im Gegensatz zu BSA bestehen die einzelnen Peptidketten des Kollagenmoleküls aus den Aminosäuren $[\text{Gly-X-Y}]_n$ – also aus Glycin (Gly), einer variablen Aminosäure (X) und Hydroxyprolin, bzw. Prolin (Y) als Primärstruktur (=Alphaketten). Variable Aminosäuren sind meist Arginin, Lysin, Glutaminsäure und Alanin. Es fehlen also insbesondere die aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan und Tyrosin, wodurch weniger Cu^{2+} hergestellt werden kann. Rittié 2017 verwendete die Lowry-Methode zur Konzentrationsbestimmung. Allerdings gibt es in dieser Arbeit keine Hinweise auf Probleme bei der Konzentrationsbestimmung. In jedem Fall wurde das Lyophilisieren und die Bestimmung der Trockenmasse beschrieben, um einerseits Kollagen aufzukonzentrieren und andererseits, um das Protein auch in ein entsprechendes Lösungsmittel für weiterführende Untersuchungen aufnehmen zu können (0,1% HAc für CGC, 2% SDS für SDS-PAGE/Coomassiefärbung für Reinheitsdarstellung). Schließlich wurde noch die Lagerung des „aufgereinigten Kollagens“ (nach 3 Neutralisationsschritten) untersucht. Eine Lagerung des in 0,1% HAc resuspendierten Pellets bei 4°C im Kühlschrank führte nach 2 Tagen zu einer Verflüssigung der Suspension. Einfrieren bei -20°C verhinderte die Verflüssigung. Daraus ließ sich für uns ableiten, dass das Kollagen bei 4°C nicht länger als 48h haltbar ist.

Tiefgefrorene Proben ließen sich problemlos wieder auftauen und für den CGC verwenden. Nachteil war jedoch, dass die Konzentration mittels BCA nicht vorab bestimmbar war. Schließlich wurde das resuspendierte Kollagen in HAc nach Konzentrationsbestimmung und Reinheitsüberprüfung (SDS-Page), sowie Funktionstestung (Kontraktionsfähigkeit) portioniert eingefroren und bei Bedarf für den CGC eingesetzt. Die Kontraktionsfähigkeit zwischen frischem - und aufgetauten Kollagen war nahezu identisch (Daten hier nicht gezeigt). Andere Arbeitsgruppen (Rittie 2017) lagerten dagegen das lyophilisierte Kollagen. Die Haltbarkeit des in 0,1% HAc gelösten Kollagens wird auch deutlich, wenn man bedenkt, dass man dieses auch käuflich erwerben kann.

Aufgrund der oben beschriebenen Probleme suchten wir nach einer Lösung in der Kollagenherstellung, die zum einen die molekulare Kollagenstruktur weitestgehend erhält und eine optimale Funktionalität des Kollagens im CGC gewährleistet.

Bell et al. 1979 beschreibt in seiner Arbeit, dass auch bereits „Rohkollagen“ im CGC eingesetzt werden kann. Hierfür wird das Kollagen wie in 3.2.1 präpariert, für 48h gerührt und unlösliche Bestandteile für 2h abzentrifugiert. Das dadurch entstandene „Rohkollagen“ kann sofort in einen CGC eingesetzt werden. Durch die „Abkürzung“ des Protokolls reduzierten sich die Fehlerquellen, die zu einem qualitativen und quantitativen Kollagenverlust führen können. Zudem kann man eher eine sterile Präparation gewährleisten. Zusätzlich kommt es durch die Vereinfachung des Protokolls zur Zeit-, Material- und Personalsparnis. Da die Positiv- und Negativkontrollen des vereinfachten Protokolls nicht von denen des ausführlichen Protokolls abwichen (4.6.6), verwendeten wir für die Medikamentenversuche ausschließlich „Rohkollagen“ nach der Methode von Bell et al (Bell et al. 1979).

5.2 Etablierung des CGC

In der vorliegenden Studie wurde das Stress Relaxation Modell verwendet, um die Wirkung verschiedener RTK-I auf die Kontraktionskraft von Lungenfibroblasten zu untersuchen. Zur Optimierung des CGC wurden verschiedene Einflussfaktoren untersucht. So findet man in der Literatur z. B. unterschiedliche Angaben zur eingesetzten Zellzahl, der Kollagenkonzentration im Gel, der Verwendung verschiedener Fibroblastentypen, etc. (Grinnell et al. 1999; Ngo et al. 2006; Bayan et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden wichtige Faktoren hinsichtlich der Kontraktionskraft von aufgereinigtem Kollagen (3xNaOH) bzw. Rohkollagen in Anlehnung an die Untersuchungen von Liu et al. (2001) untersucht.

Ein wichtiger Einflussfaktor ist die Passagenzahl der kultivierten Fibroblasten. Laut Grinnell et al kontrahieren frühe Fibroblastenpassagen besser als Spätere (Grinnell und Petroll 2010;

Steinberg et al. 1980). Bei Fibroblasten von Mausembryos wurden für 50% Kontraktion weniger Zellen benötigt, als für differenziertere Fibroblasten von ausgewachsenen Mäusen (Steinberg et al. 1980). Ein signifikanter Unterschied wurde damals allerdings erst ab Passage 15 gezeigt. Dies liegt daran, dass undifferenzierte Fibroblasten eine bessere kontraktionsfähige Matrix bilden, als bereits ausdifferenzierte Zellen. In der vorliegenden Studie wurden Rattenlungenfibroblasten verwendet, die unter Verwendung von Rohkollagen keinen signifikanten Unterschied der Kontraktionskraft in Abhängigkeit der Fibroblastenpassage zeigten (Abbildung 16). Zwischen Passage 4 und 12 konnten die Zellen mit vergleichbaren Ergebnissen verwendet werden. Bei diesen Zellen handelt es sich jedoch nicht um fetale - oder embryonale Zellen, sondern um Fibroblasten aus nativen Lungen junger Ratten, also um ausdifferenzierte Zellen. Inwieweit der Ursprung der Fibroblasten aus fibrotischem Gewebe (in unserem Fall der abgestoßenen Rattenlunge nach Transplantation) einen Einfluss auf die Kontraktionskraft hat, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass Fibroblasten aus Lungen mit zystischer Fibrose eine höhere Kontraktionskraft besitzen (Liu et al 2001). Diese Zellen bräuchten somit eine höhere Konzentration an Antifibrotika (z.B. RTK-Inhibitoren, Pirfenidone oder Nintedanib), um eine vergleichbare Hemmung der Kontraktionskraft zu erzielen, wie Zellen aus einer nativen Lunge. Auch hier ist auf die Passagenzahl zu achten (Liu et al. 2001).

Die Stoffwechsellage der Zellen könnte ebenfalls die Kontraktionskraft beeinflussen. Eine Vorbehandlung von fetalen Lungenfibroblasten mit TGF- β erhöhte deren Kontraktionskraft (Liu et al. 2001). Bei stoffwechselaktiven („aktivierten“) Fibroblasten besteht durch die Kultivierung im Serum mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren eine höhere „Kontraktionsbereitschaft“ als bei „nicht aktivierten“ Fibroblasten (Abbildung 18). Der Entzug von Wachstumsfaktoren/Serum für 24 - bzw. 48h, so wie bei Liu et al 2001 durchgeführt, beeinflusst die Vitalität der Zellen und damit auch die Kontraktionskraft. So konnten wir zeigen, dass bereits ein Serumentzug von 4h zu einer Reduktion der Stoffwechselleistung führte. Zudem war die Kontraktionskraft höher, als nach 24h Serumentzug (

Abbildung 26; hier nur mit Rohkollagen untersucht). Dies könnte daran liegen, dass bereits nach 24h die Zellen ohne Serum absterben.

Weitere Einflussfaktoren sind die Zellzahl, die Kollagenkonzentration und die FKS-Konzentration (als kontraktionsauslösendes Agens) im Überstand. Das Ausmaß der Kontraktion ist direkt proportional zur Zellzahl und indirekt proportional zur Kollagenkonzentration. Je höher die Zellzahl, desto höher die Kontraktionskraft (siehe Ngo et al. 2006, Fig. 2). Die minimale Zellzahl sollte 10^5 Zellen/Gel betragen, damit notwendige Zell-

Zell-Kontakte entstehen und eine Kontraktion stattfinden kann (Ehrlich et al. 2000, S. 86). Liu et al untersuchte $1,5 \cdot 10^5$ -, $3 \cdot 10^5$ -, $6 \cdot 10^5$ - und $12 \cdot 10^5$ Zellen/Well mit einer Kollagenkonzentration von 0,75mg/ml mit dem Ergebnis, dass zum einen die Kontraktionskraft mit steigender Zellzahl steigt und die stärkste Kontraktion bei $6 \cdot 10^5$ und $12 \cdot 10^5$ Zellen erfolgt (Liu et al. 2001, Fig. 6). Unter Einsatz von Rohkollagen konnten wir ebenfalls in unserer Studie zeigen, dass eine lineare Abhängigkeit der Kontraktionsstärke zur eingesetzten Zellzahl besteht. Bei der Verwendung von Kollagen nach 3xNaOH beobachteten wir keine Abhängigkeit (Abbildung 19). Zum einen war die finale Kollagenkonzentration durch Klumpenbildung während der Herstellung nicht korrekt zu bestimmen, zum anderen haben wir die These bezüglich dem Kollagen nach 3x NaOH mit lediglich n=1-3 untersucht. Die Aussagekraft ist hier also eingeschränkt. Bezüglich der Kultivierung höherer Zellzahlen muss auch auf Praktikabilität geachtet werden. Die Herstellung großer Zellmengen erfordert einen hohen Materialaufwand und führt zwangsläufig zu höheren Passagenzahlen. Ein Kompromiss stellt folgende Bedingung dar: $4,5 \cdot 10^5$ Zellen war eine gut kultivierbare Menge, die bei einer Kollagenkonzentration von 1mg/ml eine gute Kontraktionsspanne mit einer niedrigen Streuung brachte (Abbildung 20). Weiterhin konnte Liu et al. (2001) zeigen, dass mit steigender Kollagenkonzentration das Kontraktionsausmaß abnahm (Liu et al. 2001, Fig. 7). Wir beobachteten einen signifikanten Unterschied für Rohkollagen mit 1mg/ml und 0,25mg/ml bei $4,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well. Aufgrund der zu niedrigen Kollagenkonzentration von 0,25mg/ml war die Kontraktionsstärke im Vergleich deutlich herabgesetzt (Abbildung 28). Sowohl bei 1mg/ml, 0,75mg/ml und 0,5mg/ml beobachteten wir keinen Unterschied. Die Probenzahl war allerdings gering. Beim Einsatz von aufgereinigtem Kollagen wurde keine Abhängigkeit von der Kollagenkonzentration beobachtet (Abbildung 20). Wie bereits beschrieben, war eine genaue Konzentrationsangabe bei 3xNaOH aufgrund der Klumpenbildung nicht möglich. Daher sehen wir die erhobenen Ergebnisse aus unserer Sicht als nicht valide.

FKS enthält Wachstumsfaktoren, die zur Kontraktion beitragen. Die Stärke der Kontraktion hängt von der Serumkonzentration ab (Steinberg et al. 1980; Eckes et al. 1995, S. 250; Liu et al. 2001, Fig.4). Während Liu et al (2001) serumfrei arbeitete, konnten wir unter diesen Bedingungen keine Kontraktion auslösen. Unter unseren Versuchsbedingungen war die größte Kontraktionsspanne nur bei FKS im Überstand erreichbar. FKS im Gel war ohne Bedeutung. Zwischen aufgereinigtem Kollagen und Rohkollagen sahen wir diesbezüglich auch keinen Unterschied (Abbildung 21; Abbildung 29). Wir untersuchten zudem den Einfluss unterschiedlicher FKS-Konzentrationen im Überstand. Wir konnten zeigen, dass die Kontraktionsstärke mit steigender FKS-Konzentration und damit steigender Konzentration an

Wachstumsfaktoren im Überstand zunimmt (hier nicht dargestellt). Auch bei Liu et al (2001) konnte die Kontraktionskraft der Gele mit steigenden Konzentrationen von FKS im Überstand erhöht werden. Letztlich ist es notwendig, laborintern Vorversuche bzgl. der optimalen Zell- und Kollagenkonzentration durchzuführen.

Unabdingbar für die Nutzung des CGC ist die Etablierung geeigneter Positiv- und Negativkontrollen. Um Störfaktoren wie z.B. zusätzliche Wachstumsfaktoren durch Serum zu vermeiden, wurde bei der Gelherstellung ohne Serumzugabe gearbeitet. In Anlehnung an Liu et al überschichteten wir das Kollagengel nach dem Polymerisieren mit DMEM = Negativkontrolle. Durch die Zugabe von 10% FKS erhält man eine Positivkontrolle. Wie bereits oben beschrieben brachte die zusätzliche Verwendung von FKS im Gel keine Verbesserung der Kontraktionskraft (im Gegensatz zu Liu et al 2001). Bei Erhöhung der Versuchszahlen konnten wir zeigen, dass die Kontrollen auch für 3xNaOH-Kollagen funktionierten. Für die abschließende pharmakokinetische Testung der RTK-Inhibitoren-Versuche wurde immer Rohkollagen eingesetzt.

5.3 Verwendung von RTK-I im CGC

Der CGC wird u. a. zur Testung von Antifibrotika eingesetzt (Jin et al. 2019; Bogatkevich et al. 2009). Die Inkubation von RTK-I in diesem System zeigte (1) eine Hemmung der Kontraktion bei 100µM Imatinib, (2) keinen Effekt bis 40µM Nilotinib, und (3) eine dosisabhängige Hemmung der Kontraktion für Dasatinib ($EC_{50} = 2,4\mu M$). Während die höchste Konzentration von Imatinib eine zytotoxische Wirkung auf die Fibroblasten zeigte, hatten die höchsten Konzentrationen von Nilotinib und Dasatinib keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

In der vorliegenden Studie konnte für Imatinib nur bei 100µM eine Hemmung der Kontraktionskraft beobachtet werden. Diese Konzentration führte jedoch nach 24h auf einer Monolayerkultur zum Absterben der Zellen. Yunliang Chen et al. (2008) führte ebenfalls eine Testung von Imatinib im CGC durch. Die Arbeitsgruppe setzte jedoch nur 2nM Imatinib ein und damit um Faktor 10000 weniger als unsere niedrigste Konzentration (20µM). Allerdings wurden die verwendeten Hautfibroblasten bei Chen et al vor dem Einsetzen in das Kollagengel für 24h mit Imatinib präinkubiert und dann zusätzlich noch im Überstand des Gels behandelt. Allein die Präinkubation verhinderte bereits eine PDGF-induzierte Kontraktion der Hautfibroblasten. Imatinib reduzierte zudem die basale Kontraktionskraft von ansonsten unbehandelten SSc-Fibroblasten (im Gegensatz zu normalen Fibroblasten). Inwieweit die Präinkubation einen Einfluss auf die Kontraktionskraft hat, kann hier nicht beantwortet werden,

da die Inkubation mit Imatinib in unserem Modell lediglich im Überstand der Kollagengele erfolgte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass unbehandelte Zellen im Gel mit weniger als 2nM Imatinib in Kontakt kommen und damit keine Reaktion zeigen. Außerdem wurden bei Chen et al. 2008 humane Hautfibroblasten (aus normalem- und SSc Gewebe) verwendet, während wir normale Rattenlungenfibroblasten einsetzten. Die Wirkung von Imatinib wurde auch in anderen Zellkulturmodellen untersucht. Bei Distler et al. 2007 wurden dermale Fibroblasten mit Imatinib in einer Konzentration von 0,01µg/ml – 1µg/ml (= 0,02 bis 2µM) für 24h kultiviert. Unter diesen Bedingungen war Imatinib nicht zytotoxisch, hemmte allerdings bei 2µM die PDGF- und TGF-β-induzierte Kollagenproduktion. Beim Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung der Toxizität (XTT, ATP-basierter GellTiter-Glo, Trypanblauausschluss, TBE) von Substanzen wurde von Nowak et al 2018 gezeigt, dass Imatinib (0-10µM, 48h) ab einer Konzentration von 4µM die Zelldichte und die Stoffwechselleistung von HepG2 Zellen signifikant reduzierten. Kadivar et al untersuchte 2019 anhand von Brustkrebszellen (Zelllinie von Östrogenrezeptor-positiven Zellen und hormonnegativen Krebszellen) die Dosis- und Zeitabhängigkeit von Imatinib in Bezug auf die antiproliferative Wirkung im MTS-Assay. Hierzu wurden die Zellen für 48-, 96-, 120- und 144h mit Imatinib in einer Konzentration von 2-10µM inkubiert. Nach 48- und 96h ließ sich kein signifikanter Effekt beobachten. Ein signifikanter antiproliferativer Effekt konnte erst nach 144h, allerdings bei einer Konzentration <6µM beobachtet werden. Bei einer Konzentration >6µM konnte keine signifikante zeitabhängige antiproliferative Wirkung mehr beobachtet werden. Die mittlere Hemmkonzentration (IC₅₀) lag in diesem Modell nach einer Inkubationszeit von 144h bei 3,9µM für die Östrogenrezeptor-positive Zelllinie und bei 5,5µM für die Hormonrezeptor-negative Zelllinie. Die Wirkung von RTK-I auf die Stoffwechselleistung von Rattenlungenfibroblasten wurde auch in unserem Labor untersucht (Dissertation von M. Weps, noch nicht veröffentlicht). Die mittlere Hemmkonzentration lag nach 3 Tagen Inkubation bei $6,7 \pm 2,7\mu\text{M}$ für Imatinib, $9,6 \pm 6,7\mu\text{M}$ für Nilotinib und $9,0 \pm 0,07\mu\text{M}$ für Dasatinib. Offensichtlich spielt die Wahl der Testmethode eine entscheidende Rolle, wenn es um die Darstellung der Wirksamkeit von RTK-I geht. Bei diesen in vitro Untersuchungen muss allerdings berücksichtigt werden, dass die verwendeten Konzentrationen bzw. mittlere Hemmkonzentrationen um ein Vielfaches höher lagen, als unter in vivo Bedingungen. So beschrieb Distler et al 2007, dass 1µg/ml Imatinib unter in vitro Bedingungen etwa 400mg Imatinib in vivo entsprechen (Distler et al. 2007) - der aktuell empfohlenen Dosierung in der Erhaltungstherapie beispielsweise bei CML. Im Trachealspangenmodell in der Ratte, dass die Entwicklung einer experimentellen obliterativen Luftwegerkrankung (OAD,

oblitative airway disease) beschreibt, wurde bei Gabe von 10mg/kg Körpergewicht ein Peakwert im Plasma von 2 μ M gemessen (Krebs et al. 2005). Die Koapplikation mit einem VEGF-RTK-Inhibitor verhinderte die Entwicklung einer OAD, wobei Imatinib vorrangig für die Hemmung von SMCs (smooth muscle cells) in den Gefäßen verantwortlich gemacht wurde (Tikkanen et al. 2006).

Die 2. Generation an RTK-I's, Nilotinib, hat eine höhere Bindungsaffinität zu den RTK's als Imatinib (Kantarjian et al. 2006, S. 2543). Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Nilotinib im Kulturmedium (<50 μ M) wurde in der vorliegenden Studie lediglich die Wirkung von 20- und 40 μ M im CGC untersucht. Nilotinib hatte keinen Effekt auf die Kontraktionskraft. Zudem zeigten diese Konzentrationen keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen (Calcein-AM, 24h). Vergleichbare Untersuchungen mit diesem Modell fehlen in der Literatur. Aus früheren in vitro Studien ist allerdings bekannt, dass Nilotinib (0,001-10 μ g/ml, 1,9nM - 1,9 μ M für 24h) dosisabhängig die Konzentration von Extrazellulärmatrixproteinen bei Hautfibroblasten reduziert (IC₅₀ = 0,8 - 2,5nM; Akhmetshina et al. 2008). Die Tal- bzw. Peakkonzentrationen im Menschen liegen bei der Standarddosierung in diesem Bereich und damit wiederum um ein Vielfaches höher, als in unserer Studie untersucht (Kantarjian et al. 2006). Eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation bei Rattenlungenfibroblasten wurde in der Dissertation von M. Weps gezeigt. Zudem konnte Silveira et al. (2018) zeigen, dass die Inkubation von humanen Zellen des Nebennierenrindenkarzinoms mit Nilotinib 10 μ M über 72h zu einer Abnahme der Zellvitalität (MTS-Test) um 62,9% führte.

Dasatinib inhibiert ebenfalls über eine RTK (abl-Kinase, PDGF-Rezeptor) die Tumorzellproliferation und die Ausdifferenzierung zu Myofibroblasten (Yilmaz et al. 2015). In unserem CGC konnte eine dosisabhängige Hemmung der Kontraktion für Dasatinib beobachtet werden. Der mittlere EC₅₀ lag bei 2,4 μ M. Bis 0,5 μ M wurde keine Beeinträchtigung der Kontraktion beobachtet und die Zellen waren nach 24h bei 10 μ M noch vital. Andere Studien zeigten, dass eine Inkubation von Müllerzellen im Kollagengel mit 0,3 μ M Dasatinib für 2 Tage zu einer Hemmung der Kontraktion führte. Diese Konzentration war nicht toxisch (Tsukahara et al. 2015). In unserem Modell beobachteten wir bei dieser Konzentration keinen Effekt. Die Inkubationszeit lag allerdings auch nur bei 24h. Bei Umazume et al. (2013) wurden RPE-Zellen im Kollagengel mit Dasatinib (0,01 – 1 μ M) für 1 Stunde präinkubiert und anschließend unter Stimulation für 24h mit Dasatinib behandelt. Bereits bei 0,03 μ M wurde eine 20%ige Hemmung der Kontraktion beobachtet, bei 0,1 μ M eine vollständige Hemmung. Diese Zellen reagieren offensichtlich empfindlicher auf Dasatinib als unsere Rattenlungenfibroblasten. Die Rattenfibroblasten waren auch in der höchsten Konzentration (10 μ M) noch vital, weshalb die

Kontraktionseffekte sich am ehesten auf die medikamentöse Wirkung zurückführen lassen (Abbildung 39). Dasatinib könnte in der Reihe der RTK-I als antifibrotisches Agens besonders attraktiv sein, da bei verschiedenen Zelllinien auch eine „Normalisierung“ der Fibroblastenfunktion gezeigt werden konnte. Durch die Inkubation von CAFs (cancer associated fibroblasts) mit Dasatinib konnte der Phänotyp der CAFs in normale Fibroblasten umgekehrt werden (Haubeiss et al. 2010). Es gibt zudem auch Hinweise, dass Dasatinib eine therapeutische Option bei fibrotischen Erkrankungen sein könnte (Abdalla et al. 2015). Weiterhin hat sich Schafer et al. (2017) mit der Frage beschäftigt, inwieweit die Zellalterung (=Senescence) die Fibroseentstehung beeinflusst. Er hat die Wirkung von 20 μ M Dasatinib im Bleomycin-Lungenfibrose-Modell untersucht. Nach 3 Tagen Inkubation wurden dort >33% der Senescence-Zellen abgetötet. Inwieweit vitale gesunde Zellen bei dieser Konzentration ebenfalls abgetötet wurden, wurde in dieser Studie nicht dargestellt. Hinsichtlich der RTK-Inhibition, der guten Steuerbarkeit in der Anwendung und dem Einfluss auf das Senescence der Fibroblasten könnte Dasatinib eine wichtige Bedeutung in der Behandlung fibrotischer Erkrankungen, wie in unserem Fall der Bronchiolitis obliterans zukommen.

6 Anhang

6.1 Verwendete Materialien

Geräte und Messapparatur:

Brutschrank CO₂-Auto-Zero: Heraeus Holdings GmbH (Hanau)

Casy ® Cell Counter and Analyser System, Model TTC: Schärfe Systems GmbH (Reutlingen Germany)

E-Max Precision Microplate Reader: Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, CA USA)

Eppendorf Research 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl: Eppendorf Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf)

SpeedVac Christ ® Alpha RVC: Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen (Osterode am Harz)

Sterilbank Hera safe Heraeus ®: Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Sterilbank Laminair Heraeus ®: Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Zentrifuge Megafuge 1.0 R Heraeus Systems Sepatech: Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Zentrifuge Megafuge 1 L-R Heraeus Systems Sepatech: Heraeus Holdings GmbH (Hanau, Deutschland)

Mikroskop Fluovert FU: Leitz GmbH (Wetzlar)

Keyence Fluorenszens – Mikroskop BZ 8100 E: Keyence Deutschland GmbH (Neu-Isenburg, Deutschland)

Pipetboy acu: Integra Biosciences GmbH (Fernwald)

Vortex Mixer Heidolph Reax 2000: Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)

Waage von Sartorius CP 225 D (max. 220g, d=0,1mg): Sartorius AG (Göttingen)

Kamera Olympus E-450: Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Magnetrührer Heidolph MR 2002: Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)

Magnetrührer Heidolph MR 3001: Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)

Magnetrührer Heidolph MR 3002: Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)

Zellkulturmedien und Lösungen

DMEM 1% Glucose 500ml Sigma-Aldrich: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Fetales Kälber Serum (FKS): Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

L-Glutamin (L-) 200mM: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Gentamycin, Endkonzentration 50µl: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Amphotericin B, Konzentration 250µg/ml: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Trypsin-EDTA 10%, verwendet als 1%: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Zum Waschen der Zellen wird ein PBS-Puffer (phosphate buffered saline) nach Dulbecco mit folgender Zusammensetzung bei einem pH von 7,3-7,4 verwendet:

Inhaltsstoff	Konzentration [g/l]
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,133
KCl	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
MgCl ₂ · 2H ₂ O	0,10
NaCl	8,00
Na ₂ HPO ₄	1,15

Table 1: Zusammensetzung PBS nach Dulbecco

Weiterhin wurden verwendet:

4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI), Endkonzentration 5µg/ml: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Calcein 1mg/ml: Thermo Fischer Scientific (München)

Rhodamin-Phalloidin: Invitrogen, Thermo Fischer (München)

Fluoromount-G Eindeckmedium: Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA)

Paraformaldehyd, verwendete Konzentration 40mg/l: Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

CasyTon: Roche Deutschland Holding GmbH

Kollagen, Rat Tail tendon, 5mg/ml, 5ml: ibidi cell focus (Planegg/Martinsried, Deutschland)

Essigsäure 100%, verwendet als 0,1%: Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

NaOH Plättchen 40g/mol, verwendet als 0,1M: Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Bovines Serumalbumin (BSA), Fraction V: PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)

Bicinchoninic Acid Solution (Bradford Reagent): Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Copper (II) Sulfat Solution: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Resolving buffer 1,5M Tris-HCL 8,8/ml: BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)

Acryl-/Bisacrylamid 30%/ml; Rotiphorese ® Gel 30

SDS 10%; Dodecyl-Na-Salzpellets Serra; verwendet in 10%-Lösung

TEMED: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Ammonium-Persulfat (APS) 10%: Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Stacking buffer 1,5M Tris-HCl 6,8: BioRad Laboratories, Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)

Coomassie-Färbetabletten: Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

Falcon-Röhrchen 50ml, steril: Corning Incorporated (New York, USA)

T25 – Kulturflaschen: Nunc, Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

T75 – Kulturflaschen: Nunc, Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

T175 – Kulturflaschen: Nunc, Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

Sterilfilter 0,22µm filter pore size, low protein binding: Corning Incorporated (New York, USA)

24-well-Platte, steril: Nunc, Sigma-Aldrich life science (St. Louis, Missouri, USA)

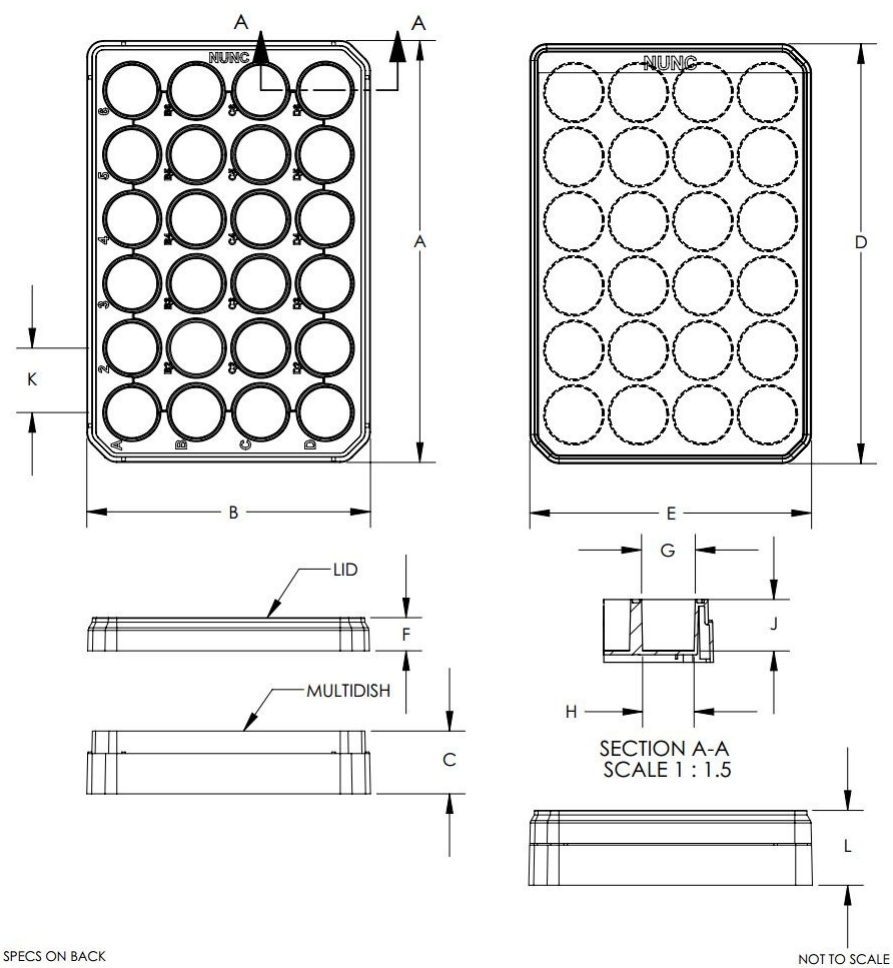
Objektträger Star Frost Plus: Menzel GmbH (Braunschweig)

8-Kammer-Objektträger

Nicht einzeln gelistet wurden:

Verschiedene Eppendorf-Cups, Pipettenspitzen, Bechergläser, Duran-Glasflaschen, unsterile Falcon-Röhrchen 15ml

6.2 Bildanhang



SPECS ON BACK

NOT TO SCALE

CATALOG NUMBER.....:	142485 & 144530	
NUMBER OF WELLS.....:	8	
MATERIALS	LID.....:	PS
	BASE.....:	PS
	INCH	MM
A (BASE LENGTH).....:	5.02	127.5
B (BASE WIDTH).....:	3.36	85.3
C (BASE HEIGHT).....:	0.74	18.8
D (LID LENGTH).....:	5.01	127.3
E (LID LENGTH).....:	3.34	84.8
F (LID HEIGHT).....:	0.39	9.9
G (WELL DIA @ TOP).....:	0.64	16.3
H (WELL DIA @ BOTTOM).....:	0.61	15.5
J (WELL DEPTH).....:	0.62	15.7
K (WELL-TO-WELL SPACING).....:	0.77	19.6
L (ASSEMBLY HEIGHT W/LID).....:	0.89	22.6
CULTURE AREA, cm ³ /WELL.....:	-	1.9
SUGGESTED WORKING VOL., mL/WELL.::	-	1.0

CATALOG NUMBER	SURFACE	COLOR	STERILE	WITH LID	UNITS PER PACK/CASE
142485	NUNC	CLEAR	YES	YES	5/85
144530	NON-TREATED	CLEAR	YES	YES	1/75

Figure 1: Technische Zeichnung 24-Well-Platte mit Abmessungen
(techsupport.labproducts.eu@thermofisher.com)

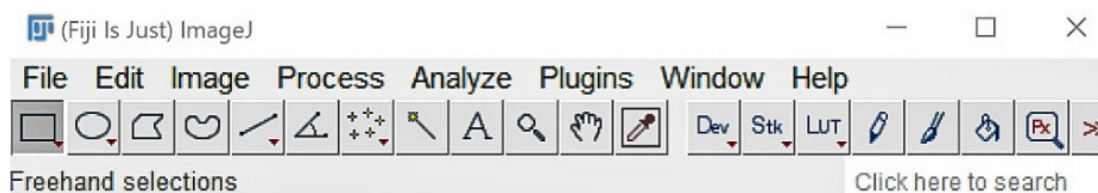


Figure 2: Startmenü Image J

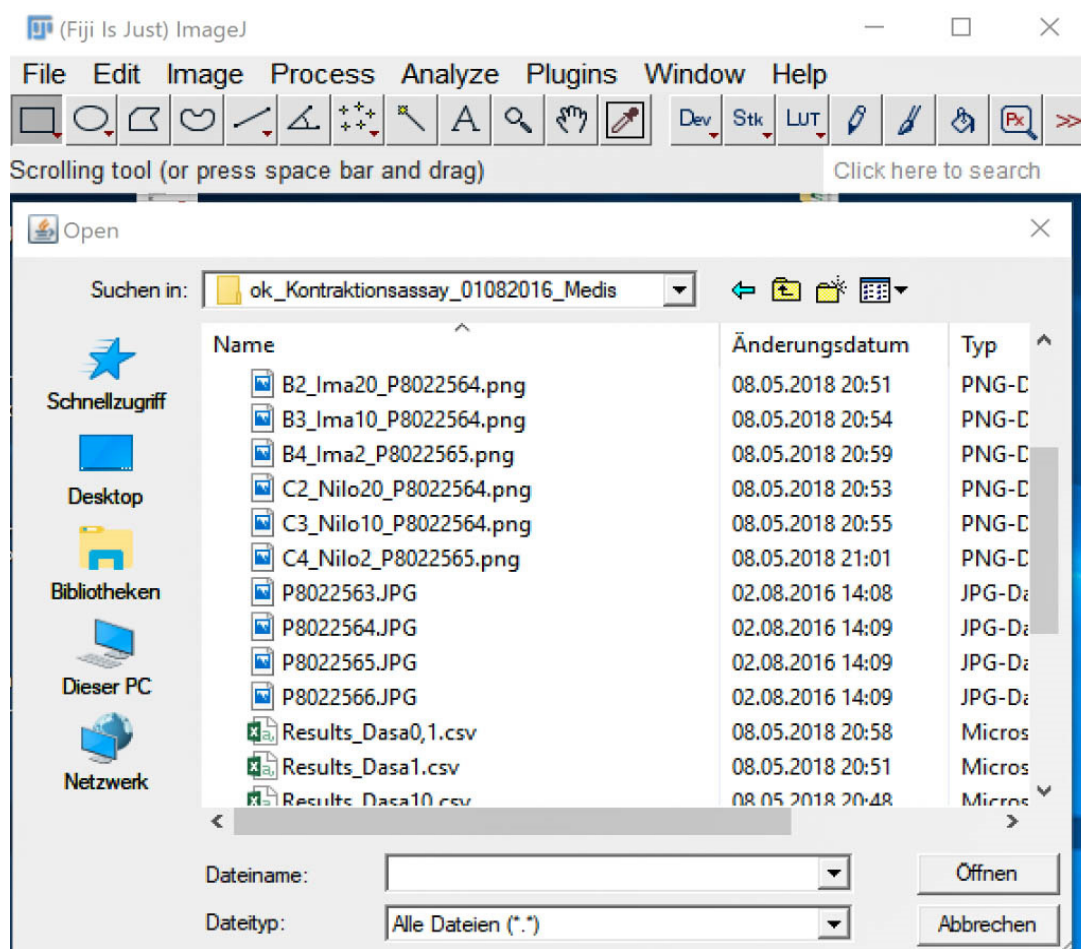


Figure 3: Unter File -> Open Gewünschte Datei auswählen

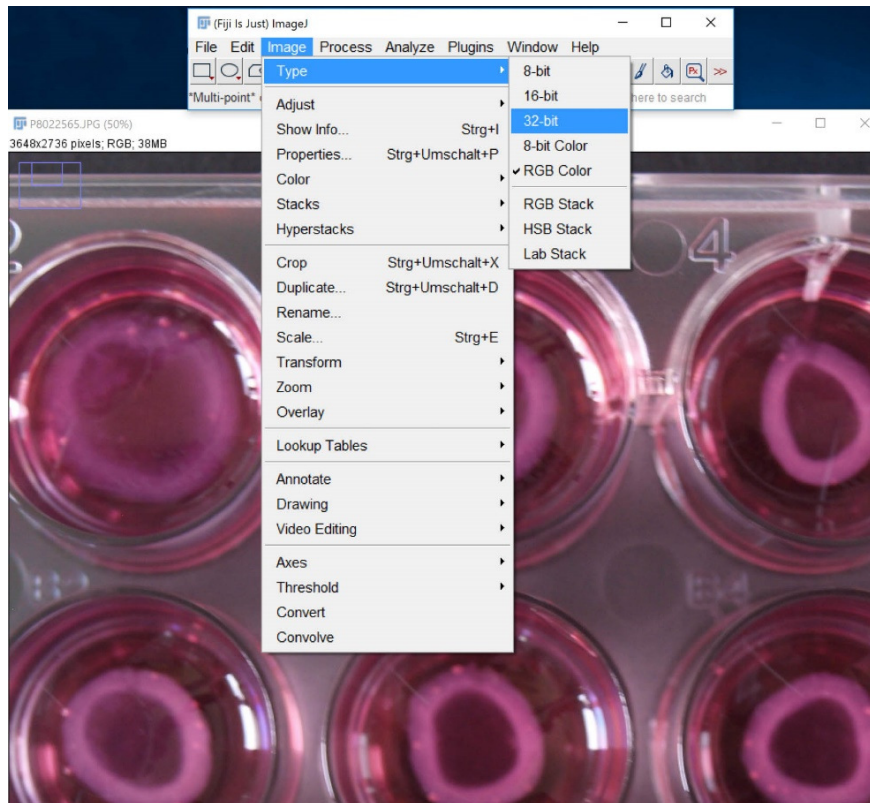


Figure 4: Bild über Image -> Type -> 32-bit auf schwarz/weiß umstellen für bessere Kontraste

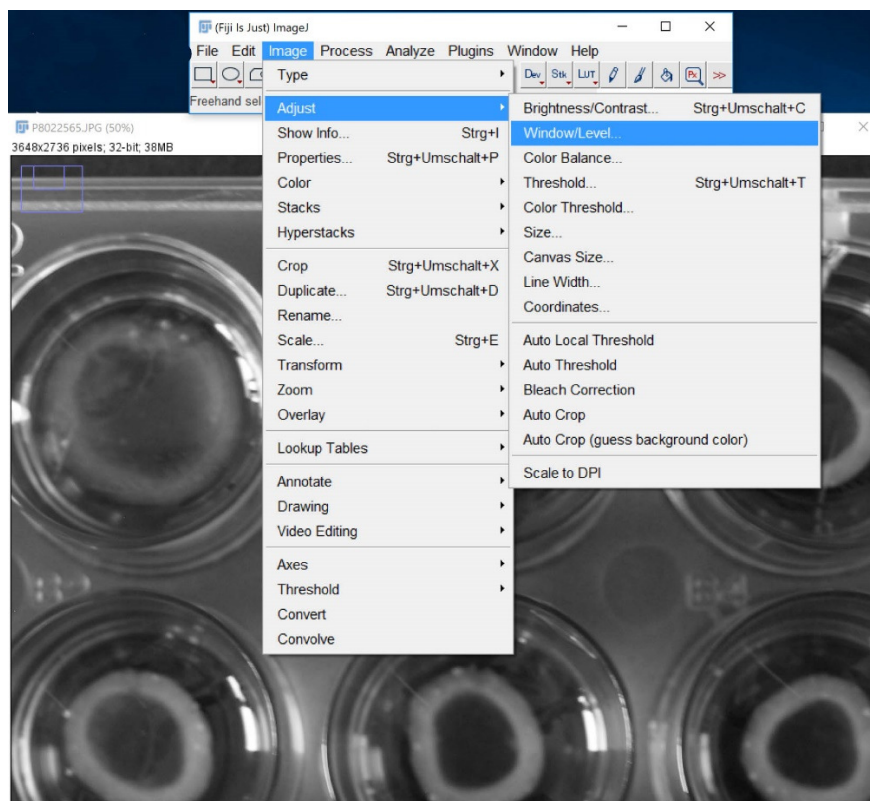


Figure 5: Kontrast verstärken über Image -> Adjust -> Window/Level

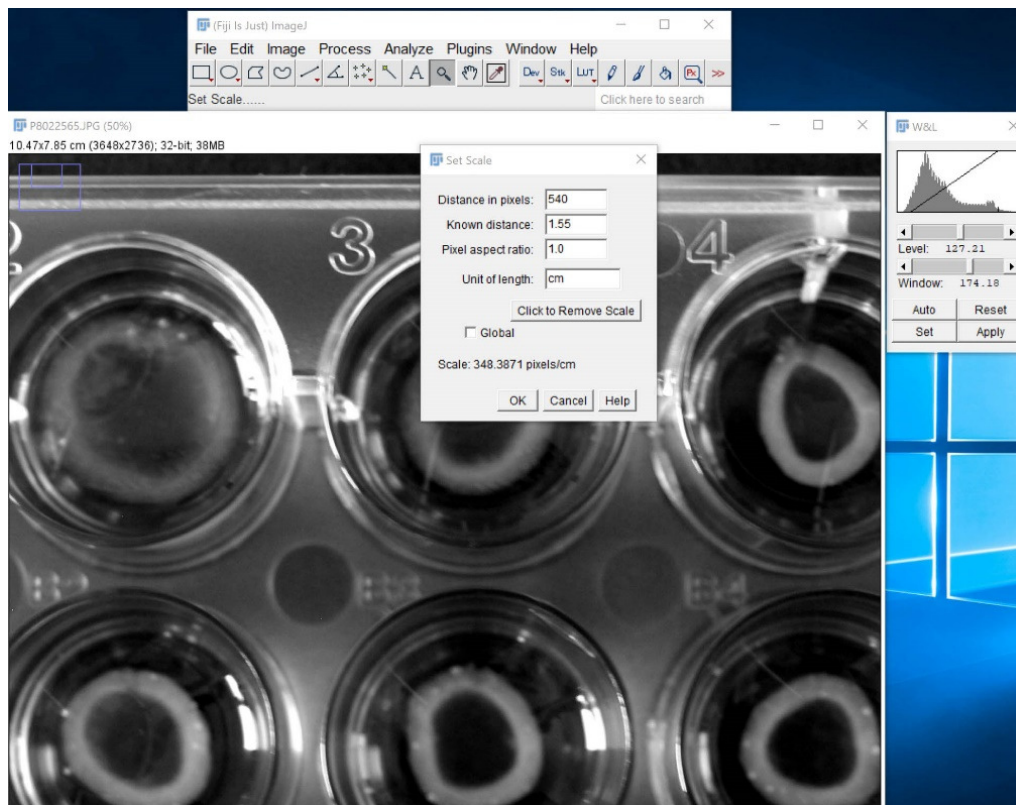


Figure 6: Über Analyze -> Set Scale Voreinstellungen zum Messen vornehmen

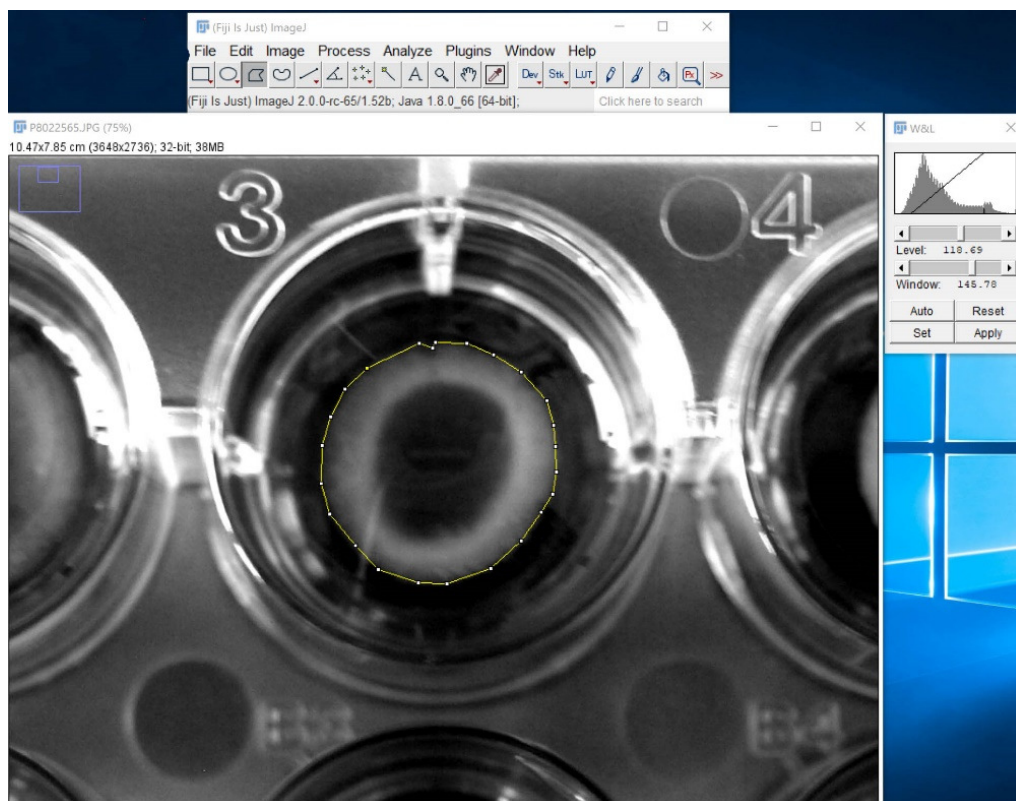


Figure 7: Umrandung freihändig der zu messenden Fläche.

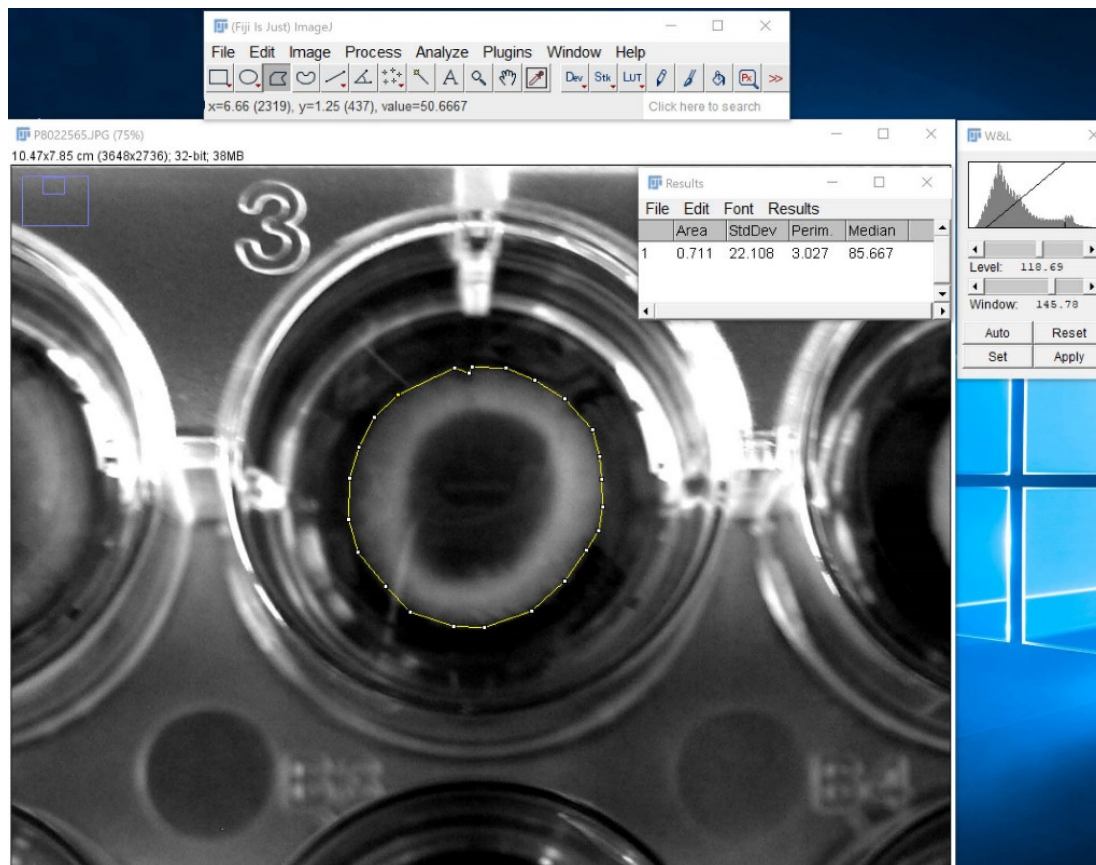


Figure 8: Über Analyze -> Measure erhält man die Fläche in cm^2 .

6.3 Messdaten

Zu Abbildung 6: Wertangaben in %

Negativkontrollen						
Präpdatum	C1	C2	C3	K1	K2	K3
16/11/2016	70,1	70,2	50,5	52,0	58,7	65,9
7/12/2016	94,3	86,9	79,8	87,1	90,2	76,3
12/12/2016	76,2	74,5	61,8	48,5	63,5	49,6
Positivkontrollen						
Präpdatum	C1	C2	C3	K1	K2	K3
16/11/2016	36,8	36,0	35,2	31,5	30,2	39,2
7/12/2016	52,2	45,8	39,9	48,3	49,5	34,8
12/12/2016	45,0	56,8	56,3	29,4	38,3	44,3

Abbildung 7: Wertangaben in %

Volumen (ml)	Gew.Col1A_1	Gew.Col1A_2	Gew.Col1A_1SDS	Gew.Col1a_2SDS	Gew.Col1A MW	Gew.Col1A SD
2,0	5,7	4,2	4,9	4,7	4,6	0,6
1,5	3,7	3,7	3,6	3,9	3,7	0,1
1,0	2,4	2,5	2,4	2,1	2,3	0,2
0,8	2,2	2,2	2,1	1,8	2,0	0,2
0,6	1,2	1,8	0,0	1,1	0,9	0,8
0,5	1,6	0,6	2,8	1,5	1,6	1,0
0,4	0,8	1,2	1,1	0,7	1,0	0,2
0,2	0,4	0,0	0,7	0,3	0,3	0,3
0,1	0,4	0,1	0,2	0,4	0,2	0,1

Zu Abbildung 8: Angabe der OD

	Konzentration (mg/ml)	BSA_SDS	BSA_HAc	Coll_7_SDS	Coll_8_HAc	Coll_R_HAc
STD01	2,5	0,9	1,4	0,4	0,25	0,43
STD02	1,88	0,8	1,2	0,3	0,19	0,3
STD03	1,41	0,6	0,9	0,2	0,12	0,26
STD04	1,06	0,5	0,8	0,2	0,1	0,18
STD05	0,8	0,4	0,6	0,17	0,08	0,15
STD06	0,6	0,3	0,4	0,13	0,08	0,12
STD07	0,45	0,3	0,4	0,09	0,05	0,08
STD08	0,33	0,2	0,3	0,08	0,04	0,07
STD09	0,25	0,2	0,2	0,05	0,03	0,05
STD10	0,19	0,1	0,1	0,05	0,01	0,03
STD11	0,14	0,11	0,11	0,03	7,0e-3	0,01
STD12	0,11	0,09	0,08	0,03	2,0e-3	
STD13	0,08	0,07	0,05	0,02	0,0	
STD14	0,06	0,06	0,04	0,02		

Zu Abbildung 9: Wertangaben in %.

Volumen (ml)	Mittl. Koll-Konz (mg/ml)	OD_HAc_1	Gewicht_HAc_1 (mg)=mg/ml, da 1mlVolumen	OD_HAc_1+ Substrat	OD_HAc_2	Gewicht_HAc_2 (mg)	OD_HAc_2+ Substrat
--------------	--------------------------	----------	---	--------------------	----------	--------------------	--------------------

2,0	4,7	0,4	5,7	0,3	0,4	4,2	0,3
1,5	3,6	0,4	3,7	0,4	0,5	3,7	0,4
1,0	2,4	0,4	2,4	0,3	0,4	2,5	0,4
0,8	1,9	0,4	2,2	0,3	0,4	2,2	0,3
0,6	1,4	0,3	1,2	0,3	0,4	1,8	0,3
0,5	1,2	0,3	1,6	0,3	0,3	0,6	0,3
0,4	1,0	0,3	0,8	0,2	0,3	1,2	0,2
0,2	0,5	0,2	0,4	0,1	0,2	0,0	0,1
0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1

Zu Abbildung 10: Wertangaben in %

Volumen	OD_SDS_1	Gewicht_SDS_1 (mg)	OD_SDS_1+ Substrat	OD_SDS_2	Gewicht_SDS_2 (mg)	OD_SDS_2 + Substrat
2,0	1,1	4,9	1,0	1,0	4,7	1,0
1,5	0,9	3,6	0,8	0,9	3,9	0,8
1,0	0,7	2,4	0,7	0,7	2,1	0,6
0,8	0,6	2,1	0,6	0,6	1,8	0,6
0,6	0,5	0,0	0,5	0,5	1,1	0,4
0,5	0,4	2,8	0,4	0,4	1,5	0,4
0,4	0,3	1,1	0,3	0,3	0,7	0,3
0,2	0,2	0,7	0,2	0,2	0,3	0,2
0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,4	0,1

Zu Abbildung 13:

Konzentration in mg/ml	Bandenintensität (relative Einheit)
2,5	219,6
1,9	175,3
1,4	128,8
1,1	75,2
0,8	68,6
0,6	49,6
0,5	38,8
0,3	34,9
0,25	27,3
0,2	26,1

Zu Abbildung 15:

Probe	Inhalt	Mg/ml	Volumen (µl)	µg/S pur	Tats. Konz. In Probe	Bande 1	Bande 2	Bande 3	Bande 4	Bande 1-4	Bande 1 (%)	Bande 2 (%)	Bande 3 (%)	Bande 4 (%)
K2	Rohkollagen	1,6	10,0	16,0	1,6	19,8	43,3	11,6	39,4	114,1	17,4	37,9	10,2	34,5
K4	Pellet 1xNaOH	1,6	10,0	16,0	1,6	22,1	47,3	13,4	44,7	127,5	17,3	37,1	10,5	35,1
K6	Pellet 3xNaOH	0,8	10,0	8,0	0,8	11,8	27,9	8,1	19,7	67,5	17,5	41,3	12,0	29,2

A2	Rohkollagen	2,2	10,0	22,0	2,2	22,3	47,1	17,8	47,1	134,3	16,6	35,1	13,3	35,1
A4	Pellet 1xNaOH	2,2	10,0	22,0	2,20	25,1	52,6	24,4	51,7	153,8	16,3	34,2	15,9	33,6
A6	Pellet 3xNaOH	0,8	10,0	8,0	0,8	8,8	22,9	7,4	20,3	59,4	14,8	38,6	12,5	34,2
C2	Rohkollagen	2,3	10,0	23,0	2,3	35,7	69,4	27,7	74,8	207,6	17,2	33,4	13,3	36,0
C4	Pellet 1xNaOH	2,8	10,0	28,0	2,8	37,3	71,2	29,7	73,9	212,1	17,6	33,6	14,0	34,8
C6	Pellet 3xNaOH	1,4	10,0	14,0	1,4	19,8	42,9	13,0	39,2	114,9	17,2	37,3	11,3	34,1
STD3	STD 3	1,4	10,0	14,0	1,4	22,2	45,8	17,4	45,4	130,8	16,9	35,0	13,3	34,7
MW											16,9	36,4	12,6	34,1
SD											0,8	2,5	1,7	1,9
SD (%)											4,9	7,0	13,6	5,4

Zu Abbildung 16: Wertangaben in %

Kultur	Passage	Vorbehandlung	Positiv (cm ²)	Negativ (cm ²)	Positiv (%)	Negativ (%)
520	4	4h serumfrei	0,56	1,25	29,74	65,63
520	4	4h serumfrei	0,57	1,32	29,79	69,58
520	5	4h serumfrei	0,48	1,40	25,00	73,63
520	5	4h serumfrei	0,47	1,43	24,95	75,21
518	5	4h serumfrei	0,40	0,85	20,95	44,53
518	5	4h serumfrei	0,40	0,86	21,16	45,26
518	6	4h serumfrei	0,28	0,52	14,63	27,11
518	6	4h serumfrei	0,34	0,55	18,05	28,79
518	8	4h serumfrei	0,56	0,94	29,74	49,58
518	8	4h serumfrei	0,45	0,97	23,89	51,11
518	9	24h serumfrei	0,44	0,87	23,32	45,95
518	9	24h serumfrei	0,45	0,91	23,63	47,95
518	9	24h serumfrei	0,43	0,63	22,79	33,16
518	9	24h serumfrei	0,38	0,65	20,05	34,11
518	9	24h serumfrei	0,37	0,72	19,68	37,95
518	9	24h serumfrei	0,48	0,81	25,47	42,58
518	10	24h serumfrei	0,58	0,94	30,47	49,21
518	10	24h serumfrei	0,73	0,87	38,42	45,84
518	10	24h serumfrei	0,69	0,76	36,26	40,00
518	10	24h serumfrei	0,34	0,46	17,89	24,42

518	10	24h serumfrei	0,49	0,69	25,79	36,26
518	10	24h serumfrei	0,49	0,54	25,89	28,47
475	5	4h serumfrei	0,23	0,57	12,26	29,89
475	5	4h serumfrei	0,33	0,59	17,47	31,16
475	5	4h serumfrei	0,42	0,62	21,84	32,73
475	5	4h serumfrei	0,23	0,68	11,93	35,63
475	5	4h serumfrei	0,24	0,67	12,51	35,19
475	5	4h serumfrei	0,23	0,68	11,85	35,79
475	6	4h serumfrei	0,50	1,22	26,37	64,05
475	6	4h serumfrei	0,41	1,25	21,74	65,74
475	6	4h serumfrei	0,31	0,89	16,48	47,09
475	6	4h serumfrei	x	0,97	x	50,85
475	6	4h serumfrei	0,34	0,90	17,97	47,13
475	6	4h serumfrei	x	0,92	x	48,38
475	6	4h serumfrei	0,33	0,97	17,47	50,85
475	6	4h serumfrei	x	0,94	x	49,60
475	6	16h serumfrei	0,50	0,74	26,51	39,17
475	6	16h serumfrei	x	0,76	x	40,21
475	6	24h serumfrei	0,58	0,99	30,65	52,12
475	6	24h serumfrei	x	1,03	x	54,37
475	6	4h serumfrei	0,29	0,68	15,35	35,84
475	6	4h serumfrei	0,30	0,75	15,63	39,36
475	7	24h serumfrei	0,44	0,81	23,27	42,46
475	7	24h serumfrei	0,40	0,85	20,91	44,78
475	7	4h serumfrei	0,26	0,90	13,87	47,38
475	7	4h serumfrei	0,26	0,90	13,48	47,62
475	8	4h serumfrei	0,64	1,24	33,89	65,11
475	8	4h serumfrei	0,38	1,40	20,21	73,79
475	8	4h serumfrei	0,35	0,80	18,42	42,21
475	8	4h serumfrei	x	0,78	x	41,28
475	8	4h serumfrei	0,31	0,91	16,48	48,01
475	8	4h serumfrei	x	1,02	x	53,94
475	8	4h serumfrei	0,34	0,91	17,90	47,91
475	8	4h serumfrei	x	0,98	x	51,73
475	8	16h serumfrei	0,65	1,22	34,17	64,42
475	8	16h serumfrei	x	0,97	x	50,85
475	8	16h serumfrei	0,56	1,24	29,38	65,51
475	8	16h serumfrei	x	0,96	x	50,53
475	8	24h serumfrei	0,41	0,92	21,83	48,48
475	8	24h serumfrei	x	0,92	x	48,38
475	8	24h serumfrei	0,26	0,95	13,91	50,23
475	8	24h serumfrei	x	0,94	x	49,31
475	8	4h serumfrei	0,27	0,77	14,32	40,64
475	8	4h serumfrei	0,27	0,88	14,18	46,42
475	9	4h serumfrei	0,23	0,97	12,19	51,15
475	9	4h serumfrei	0,25	1,18	13,38	62,29
475	10	4h serumfrei	0,44	1,29	23,00	68,00

475	10	4h serumfrei	0,44	1,33	23,26	69,79
475	11	4h serumfrei	0,79	1,30	41,78	68,41
475	11	4h serumfrei	0,59	1,12	30,92	58,87
475	11	4h serumfrei	0,43	0,86	22,74	45,28
475	11	4h serumfrei	0,49	0,89	25,99	46,91
475	12	4h serumfrei	0,35	0,92	18,64	48,24
475	12	4h serumfrei	0,50	0,91	26,15	47,92
W23	4	4h serumfrei	0,39	0,89	20,32	46,63
W23	4	4h serumfrei	0,37	0,90	19,28	47,23
W23	6	4h serumfrei	0,33	0,99	17,20	52,06
W23	8	4h serumfrei	0,22	0,76	11,52	39,78
W23	8	4h serumfrei	0,31	0,66	16,32	34,65
W23	10	4h serumfrei	0,30	0,93	15,83	48,92
W23	10	4h serumfrei	0,36	0,94	18,77	49,49
W23	11	4h serumfrei	0,27	0,94	14,41	49,22
W23	11	4h serumfrei	0,26	0,85	13,76	44,78
W23	12	4h serumfrei	0,26	0,75	13,75	39,69
W23	12	4h serumfrei	0,27	0,67	14,27	35,44
W26	4	4h serumfrei	0,25	0,78	13,09	41,28
W26	4	4h serumfrei	0,25	0,79	12,99	41,66
W26	6	4h serumfrei	0,30	0,70	15,76	36,98
W26	8	4h serumfrei	0,28	0,72	14,74	37,68
W26	8	4h serumfrei	0,28	0,67	14,61	35,40
W26	10	4h serumfrei	0,35	0,87	18,65	45,68
W26	10	4h serumfrei	0,39	0,85	20,29	44,52
W26	12	4h serumfrei	0,22	0,71	11,69	37,38
W26	12	4h serumfrei	0,23	0,76	12,05	40,01
W30	4	4h serumfrei	0,45	1,27	23,53	67,01
W30	4	4h serumfrei	0,49	1,30	25,61	68,41
W30	6	4h serumfrei	0,41	1,09	21,83	57,29
W30	7	4h serumfrei	0,36	1,00	18,68	52,45
W30	7	4h serumfrei	0,37	0,89	19,62	47,09
W30	8	4h serumfrei	0,27	1,04	14,41	54,60
W30	8	4h serumfrei	0,30	1,06	15,56	55,89
W30	10	4h serumfrei	0,39	1,24	20,53	65,52
W30	10	4h serumfrei	0,40	1,24	20,92	65,52
W30	11	4h serumfrei	0,37	1,32	19,72	69,54
W30	11	4h serumfrei	0,35	1,30	18,56	68,41
W30	12	4h serumfrei	0,32	1,56	16,68	82,10
W30	12	4h serumfrei	0,36	1,47	18,90	77,41

Zu Abbildung 18: Wertangaben in %

Datum	Aktiv, 0% Gel, 0% ÜS	Aktiv, 0% Gel, 10% ÜS	Nicht aktiv, 0% Gel, 0% ÜS	Nicht aktiv, 0% Gel, 10% ÜS
26/7/2016	44,1	34,6	60,1	37,2
	46,8	33,6	59,5	36,4

	x	xx	61,9	38,9
	x	xx	57,1	29,7
19/7/2016	46,7	47,2	72,8	37,2
	59,2	35,1	x	x
	44,5	x	x	x
	x	xx	x	x
1/8/2016	41,8	36,8	55,7	32,1
	47,7	38,7	53,7	32,4
	46,2	41,6	46,1	x
	35,5	x	34,5	x
2/8/2016	50,8	34,5	61,7	23,1
	53,0	33,4	39,8	20,6
	52,4	33,9	61,9	20,7
	46,6	27,9	62,7	x
1/6/2016	x	41,3	x	34,4
	x	xx	x	x
15/6/2016	44,1	18,1		
25/10/2016	46,8	34,6	71,3	31,9
			67,8	30,4
			66,1	30,7
			66,4	x
			60,1	37,2
			59,5	36,4
x=nicht genug Zellen			61,9	38,9
xx=Partner fehlt			57,1	29,7

Zu Abbildung 19: Wertangaben in %

Datum	1e ⁵ /Well	2,5e ⁵ /Well	4,5e ⁵ /Well	9,5e ⁵ /Well
06/06/2016	48,4	43,8	40,4	29,0
	53,9	62,8	59,1	38,2
15/06/2016	57,9		70,9	
05/07/2016	27,3		72,7	

Zu Abbildung 20: Wertangaben in %

Datum	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	0,75 mg/ml	1 mg/ml
06/06/2016	42,7	39,4	39,54	42,7
	39,6	26,3	37,0	42,8

Zu Abbildung 21: Wertangaben in %

*X = nicht genügend Zellen

Datum	0%FKS Gel, 0% FKS im ÜS	0%FKS Gel, 10% FKS im ÜS	10%FKS Gel, 10% FKS im ÜS	10%FKS Gel, 0% FKS im ÜS
15/7/2016	60,3	35,5	68,3	
	56,3	43,7	68,6	
26/7/2016	60,1	37,2	33,8	
	59,5	36,4	35,1	
	61,9	38,9	36,6	
	57,1	29,7	41,6	
19/7/2016	72,8	37,2	44,6	

25/10/2016	71,3	31,9	39,7	58,7
	67,8	30,4	36,8	62,9
	66,1	30,7	37,6	60,7
	66,4	x	x	60,0
1/8/2016	55,7	32,1	30,5	
	53,7	32,4	39,7	
	46,1	x	50,8	
	34,5	x	x	
2/8/2016	61,7	23,1	50,8	
	39,8	20,6	53,0	
	61,9	20,79	52,49	
	62,7	x	46,6	
1/6/2016	x	34,4	52,4	
	x	x	46,6	

Zu Abbildung 23: Wertangaben in %

*X= schlechte Gelbildung

*X1 = Positivkontrolle fehlt

*X2 = Gele gerissen

*X3 = schlechte Kontraktion bei zu dünner Gelmatrix

Rohkollagen		
Datum	Negativ	positiv
29/11/2016	45,95	23,32
	47,95	23,63
	33,16	22,79
	34,11	20,05
	37,95	19,68
	42,58	25,47
14/12/2016	49,21	30,47
	45,84	38,42
	40,00	36,26
	24,42	17,89
	36,26	25,79
	28,47	25,89
24/1/2017	44,53	20,95
	45,26	21,16
1/2/2017	60,05	29,11
	57,16	25,84
6/2/2017	35,00	24,32
	30,05	22,84
21/2/2017	34,21	18,05
	32,63	17,00
7/3/2017	27,11	14,63
	28,79	18,05
14/3/2017	49,58	29,74
	51,11	23,89
16/5/2017	65,63	29,74
	69,58	29,79
22/5/2017	73,63	25,00
	75,21	24,95

2/5/2018	38,32	14,82
	36,39	20,51
7/5/2018	65,47	24,02
	64,21	16,26
14/5/2018	62,98	29,40
	75,51	21,30
22/5/2018	67,98	22,98
	69,77	23,25
7/5/2018	42,46	23,27
	44,78	20,91
17/8/2019	47,09	16,48
	50,85	12,20
	43,92	12,61
	47,21	
	48,11	
	48,45	
18/9/2018	39,17	26,51
	40,21	
18/9/2018	52,12	30,65
	54,37	
24/9/2018	42,21	18,64
	41,28	16,48
	48,01	17,90
	53,94	
	47,91	
	51,73	
25/9/2018	64,42	34,17
	50,85	
25/9/2018	48,48	21,83
	48,38	
5/11/2018	35,19	12,51
	35,79	11,85
	32,73	21,84
	35,63	11,93
12/11/2018	35,84	15,35
	39,36	15,63
19/11/2018	47,38	13,87
	47,62	13,48
26/11/2018	40,64	14,32
	46,42	14,18
3/12/2018	51,15	12,19
	62,29	13,38
10/12/2018	45,28	22,74
	46,91	25,99
17/12/2018	48,24	18,64
	47,92	26,15
28/1/2019	46,63	20,32
	47,23	19,28
	41,28	13,09
	41,66	12,99
	67,01	23,53

	68,41	25,61
4/2/2019	52,06	17,20
5/2/2019	36,98	15,76
	68,03	25,92
11/2/2019	52,45	18,68
	47,09	19,62
18/2/2019	39,78	11,52
	34,65	16,32
	37,68	14,74
	35,40	14,61
	54,69	14,41
	55,93	15,56
4/3/2019	48,92	15,83
	49,49	18,77
	45,68	18,65
	44,52	20,29
	65,52	20,53
	65,52	20,92
12/3/2019	49,22	14,41
	44,78	13,76
	69,54	19,72
	68,41	18,56
18/3/2019	39,69	13,75
	35,44	14,27
	37,38	11,69
	40,01	12,05
	82,10	16,68
	77,41	18,90

1xNaOH

Datum	Negativ	positiv	Bemerkung
29/11/2016	*X	*X	Nicht verwendet
	*X	38,4	Nicht verwendet
	*X	*X	Nicht verwendet
	42,1	39,6	Nicht verwendet
	*X	*X	Nicht verwendet
	40,6	52,2	Nicht verwendet
7/3/2017	35,6	40,7	Verwendet
	39,3	40,6	Verwendet
16/5/2017	68,1	31,8	Verwendet
	69,0	33,1	Verwendet
22/5/2017	50,3	15,0	Verwendet
	52,9	13,2	Verwendet

3xNaOH

Datum	Negativ	Positiv	Bemerkung
15/7/2016	60,3	35,5	verwendet
	56,3	43,7	verwendet
26/7/2016	60,1	37,2	verwendet
	59,5	36,4	verwendet
	61,9	38,9	verwendet
	57,1	29,7	verwendet
19/7/2016	70,6	37,2	*X2

1/8/2016	55,7	x	*X1
	53,7	32,1	verwendet
	46,1	32,4	verwendet
	34,5	x	*X1
	59,0	24,5	verwendet
2/8/2016	61,7	23,1	verwendet
	39,8	20,6	verwendet
	61,9	20,7	verwendet
	62,7	X	*X1
25/10/2016	71,3	31,9	*X3
	67,8	30,4	*X3
	66,1	30,7	*X3
	66,4	X	*X3
3/8/2016	60,8	45,1	verwendet
	58,5	35,8	verwendet
9/8/2016	28,3	19,9	verwendet
	32,5	24,6	verwendet
13/9/2016	42,1	27,5	verwendet
	55,2	33,1	verwendet
	46,8	25,9	verwendet
9/11/2016	51,3	38,2	*X3
	50,8	19,7	*X3
	53,8	18,1	*X3
22/11/2016	42,0	30,4	verwendet
	43,1	27,2	verwendet
	40,7	37,1	verwendet
6/12/2016	13,0	43,9	*X3
	14,8	35,5	*X3
	27,5	19,4	*X3
	25,4	42,2	*X3
	37,8	36,6	*X3
	32,1	46,4	*X3
	15,1	49,3	*X3
	24,5	49,2	*X3
	28,1	44,3	*X3
	33,5	41,7	*X3
	27,1	46,6	*X3
	22,2	44,6	*X3
14/12/2016	X	X	*X3
	48,7	44,0	*X3
	59,3	41,5	*X3
7/3/2017	53,0	43,6	*X3
	48,5	36,4	*X3
16/5/2017	60,9	29,1	*X3
	61,8	32,5	*X3
22/5/2017	50,4	27,9	verwendet
	45,8	24,1	verwendet

Zu Abbildung 24: Wertangaben in %

Zeit in h	Positiv-1	Positiv-2	MW pos	SD positiv	Negativ-1	Negativ-2	MW neg	SD negativ
--------------	-----------	-----------	--------	---------------	-----------	-----------	--------	---------------

0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0
4,0	90,0	84,4	87,2	2,8	79,0	81,7	80,3	1,3
8,0	38,0	33,7	35,9	2,1	46,6	41,1	43,8	2,8
12,0	30,5	27,1	28,8	1,7	37,5	34,4	35,9	1,5
14,0	27,7	24,7	26,2	1,5	37,1	33,2	35,2	1,9
16,0	26,1	24,1	25,1	1,0	25,3	24,8	25,0	0,2
18,0	25,3	24,8	25,0	0,2	34,5	31,4	32,9	1,6
20,0	25,7	24,7	25,2	0,5	35,1	31,3	33,2	1,9
24,00	23,7	21,7	22,70	1,0	34,1	29,8	31,9	2,2

Zu Abbildung 25: Wertangaben in %

Aktivierte Zellen	
0% Gel 0% ÜS (negativ)	0% Gel 10% ÜS (positiv)
58,9	54,9
28,2	30,6
Nicht aktivierte Zellen	
0% Gel 0% ÜS (negativ)	0% Gel 10% ÜS (positiv)
38,32	14,82
36,39	20,51
65,47	24,02
64,21	16,26
62,98	29,40
75,51	21,30
67,98	22,98
69,77	23,25
42,46	23,27
44,78	20,91
55,92	19,57
60,39	21,34
55,96	20,74
57,46	x
60,39	x
58,90	x
39,17	26,51
40,21	x
52,12	30,65
54,37	x
42,21	18,64
41,28	x
48,01	16,48
53,94	x
47,91	17,90
51,73	x
64,42	34,17
50,85	x
48,48	21,83
48,38	x
35,19	12,51
35,79	11,85
32,73	21,84
35,63	11,93

35,84	15,35
39,36	15,63
47,38	13,87
47,62	13,48
40,64	14,32
46,42	14,18
51,15	12,19
62,29	13,38
45,28	22,74
46,91	25,99
48,24	18,64
47,92	26,15
46,63	20,32
47,23	19,28
41,28	13,09
41,66	12,99
67,01	23,53
68,41	25,61
52,06	17,20
36,98	15,76
68,03	25,92
52,45	18,68
47,09	19,62
39,78	11,52
34,65	16,32
37,68	14,74
35,40	14,61
54,69	14,41
55,93	15,56
48,92	15,83
49,49	18,77
45,68	18,65
44,52	20,29
65,52	20,53
65,52	20,92
49,22	14,41
44,78	13,76
69,54	19,72
68,41	18,56
39,69	13,75
35,44	14,27
37,38	11,69
40,01	12,05
82,10	16,68
77,41	18,90
X=kein Partner	

Zu Abbildung 26: Wertangaben in %

	4h positiv	4h negativ	24h positiv	24h negativ
24/1/2017	20,9	44,5		

	21,2	45,3		
7/3/2017	14,6	27,1		
	18,1	28,8		
14/3/2017	29,7	49,6		
	23,9	51,1		
16/5/2017	29,74	65,63		
	29,79	69,58		
22/5/2017	25,00	73,63		
	24,95	75,21		
14/12/2016			30,47	49,21
			38,42	45,84
			36,26	40,00
			17,89	24,42
			25,79	36,26
			25,89	28,47
29/11/2016			23,32	45,95
			23,63	47,95
			22,79	33,16
			20,05	34,11
			19,68	37,95
			25,47	42,58
1/2/2017	29,11	60,05		
	25,84	57,16		
6/2/2017	24,32	35,00		
	22,84	30,05		
21/2/2017	18,05	34,21		
	17,00	32,63		
2/5/2018	14,82	38,32		
	20,51	36,39		
7/5/2018	24,02	65,47		
	16,26	64,21		
14/5/2018	29,40	62,98		
	21,30	75,51		
22/5/2018	22,98	67,98		
	23,25	69,77		
7/5/2018			23,27	42,46
			20,91	44,78
17/8/2019	16,48	47,09		
	12,20	50,85		
	12,61	43,92		
	x	47,21		
	x	48,11		
	x	48,45		
18/9/2018				
24/9/2018			30,65	52,12
			x	54,37
	18,64	42,21		
	16,48	41,28		
	17,90	48,01		
	x	53,94		

25/9/2018	x	47,91		
25/9/2018	x	51,73		
5/11/2018				
			21,83	48,48
			x	48,38
	12,51	35,19		
12/11/2018	11,85	35,79		
	21,84	32,73		
19/11/2018	11,93	35,63		
	15,35	35,84		
26/11/2018	15,63	39,36		
	13,87	47,38		
3/12/2018	13,48	47,62		
	14,32	40,64		
10/12/2018	14,18	46,42		
	12,19	51,15		
17/12/2018	13,38	62,29		
	22,74	45,28		
28/1/2019	25,99	46,91		
	18,64	48,24		
	26,15	47,92		
	20,32	46,63		
	19,28	47,23		
	13,09	41,28		
4/2/2019	12,99	41,66		
5/2/2019	23,53	67,01		
	25,61	68,41		
11/2/2019	17,20	52,06		
	15,76	36,98		
18/2/2019	25,92	68,03		
	18,68	52,45		
	19,62	47,09		
	11,52	39,78		
	16,32	34,65		
	14,74	37,68		
4/3/2019	14,61	35,40		
	14,41	54,69		
	15,56	55,93		
	15,83	48,92		
	18,77	49,49		
	18,65	45,68		
12/3/2019	20,29	44,52		
	20,53	65,52		
	20,92	65,52		
	14,41	49,22		
18/3/2019	13,76	44,78		
	19,72	69,54		
	18,56	68,41		
	13,75	39,69		
	14,27	35,44		

	11,69	37,38		
x=ohne Partner	passenden			

Zu Abbildung 27: Wertangaben in %

	1e ⁵ Zellen/Well	2,5e ⁵ Zellen/Well	4,5e ⁵ Zellen/Well	9,5e ⁵ Zellen/Well
12/11/18	26,8	18,6	15,3	17,0
	28,2	20,4	15,6	12,5
10/12/18	41,8	31,0	22,7	12,5
	32,2	20,0	26,0	13,8
18/02/19	36,1	22,6	14,4	
			15,6	

Zu Abbildung 28: Wertangaben in %

	0,25mg/ml	0,5mg/ml	0,75mg/ml	1,0mg/ml
05/08/18	40,2	23,1	10,4	12,5
	38,0	16,9	12,2	11,8
11/02/19	33,8	15,8	19,2	18,7
	29,6	18,5	16,7	19,6

Zu Abbildung 29: Wertangaben in %

	0% Gel, 10% ÜS	0%Gel, 10%ÜS	10%Gel, 10% ÜS	10%Gel, 0% ÜS
29/11/2016	23,32	45,95		
	23,63	47,95		
	22,79	33,16		
	20,05	34,11		
	19,68	37,95		
	25,47	42,58		
14/12/2016	30,47	49,21		
	38,42	45,84		
	36,26	40,00		
	17,89	24,42		
	25,79	36,26		
	25,89	28,47		
24/01/2017	20,95	44,53		
	21,16	45,26		
01/02/2017	29,11	60,05		
	25,84	57,16		
06/02/2017	24,32	35,00		
	22,84	30,05		
21/02/2017	18,05	34,21		
	17,00	32,63		
07/03/2017	14,63	27,11		
	18,05	28,79		
14/03/2017	29,74	49,58	28,3	36,5
	23,89	51,11	28,5	38,1
16/05/2017	29,74	65,63	23,9	45,3
	29,79	69,58	23,2	45,5
22/05/2017	25,00	73,63		
	24,95	75,21		
02/05/2018	14,82	38,32		

	20,51	36,39		
07/05/2018	24,02	65,47		
	16,26	64,21		
14/05/2018	29,40	62,98		
	21,30	75,51		
22/05/2018	22,98	67,98		
	23,25	69,77		
07/05/2018	23,27	42,46		
	20,91	44,78		
17/08/2019	16,48	47,09		
	12,20	50,85		
	12,61	43,92		
		47,21		
		48,11		
		48,45		
18/09/2018	26,51	39,17		
		40,21		
18/09/2018	30,65	52,12		
		54,37		
24/09/2018	18,64	42,21		
	16,48	41,28		
	17,90	48,01		
		53,94		
		47,91		
		51,73		
25/09/2018	34,17	64,42		
		50,85		
25/09/2018	21,83	48,48		
		48,38		
05/11/2018	12,51	35,19	11,6	22,7
	11,85	35,79	11,8	32,8
	21,84	32,73		
	11,93	35,63		
12/11/2018	15,35	35,84		
	15,63	39,36		
18/11/2018	13,87	47,38	12,3	22,5
	13,48	47,62	12,6	22,9
26/11/2018	14,32	40,64		
	14,18	46,42		
03/12/2018	12,19	51,15		
	13,38	62,29		
10/12/2018	22,74	45,28		
	25,99	46,91		
17/12/2018	18,64	48,24		
	26,15	47,92		
28/01/2019	20,32	46,63		
	19,28	47,23		
	13,09	41,28		
	12,99	41,66		
	23,53	67,01		
	25,61	68,41		

04/02/2019	17,20	52,06		
05/02/2019	15,76	36,98		
	25,92	68,03		
11/02/2019	18,68	52,45	18,6	35,8
	19,62	47,09	18,3	34,1
18/02/2019	11,52	39,78		

Zu Abbildung 30: Wertangaben in %

	100µM	20µM	positiv	negativ
24/01/2017	32,68	24,05	20,95	44,53
	32,53	21,26	21,16	45,26

Zu Abbildung 31: Wertangaben in %

	100µM	20µM	Positiv	negativ
24/1/2017	32,68	24,05	20,95	44,53
	32,53	21,26	21,16	45,26
1/2/2017	36,58	26,79	29,11	60,05
	37,53	26,89	25,84	57,16
4/2/2019	33,78	21,04	15,76	36,98
	31,64	18,20	-	-
	32,75	20,22	-	-
5/2/2019	32,47	18,08	15,76	36,98
	32,49	17,90		
	33,36	17,67		
5/2/2019	41,28	24,33	21,83	57,29
	40,21	25,23		
	40,21	24,60		

Zu Abbildung 33: Wertangaben in %

	40µM	20µM	positiv	negativ
24/01/2017	19,32	23,74	20,95	44,53
	20,37	20,74	21,16	45,26

Zu Abbildung 34: Wertangabe in %

	40µM	29µM	Positiv	negativ
24/1/2017	19,32	23,74	20,95	44,53
	20,37	20,74	21,16	45,26
1/2/2017	22,05	20,11	29,11	60,05
	21,84	20,21	25,84	57,16
4/2/2019	24,15	19,45	17,20	52,06
	22,67	16,24	-	-
	21,04	18,64	-	-
5/2/2019	19,73	16,81	15,76	36,98
	19,07	16,73	-	-
	21,04	16,19	-	-
5/2/2019	26,10	24,35	21,83	57,29
	21,79	21,04	-	-
	24,35	23,49	-	-

Zu Abbildung 36: Wertangaben in %

	10µM	5µM	2,50µM	1,0µM	positiv	negativ
--	------	-----	--------	-------	---------	---------

24/01/2017	51,63	45,63	42,53	29,74	20,95	44,53
	52,89	47,37	38,00	29,32	21,16	45,26

Zu Abbildung 38: Wertangaben in %

	10µM	5µM	2,5µM	1,0µM	0,5µM	0,1µM	Positiv	negativ
24/1/2017	51,63	45,63	42,53	29,74			20,95	44,53
	52,89	47,37	38,0	29,32			21,16	45,26
1/2/2017	72,74	63,16	53,21	37,58			29,11	60,05
	66,42	56,21	51,05	37,79			25,84	57,16
21/2/2017	42,05	36,63	31,32	25,00	19,21	19,95	18,05	34,21
	42,37	37,89	33,42	24,47	20,11	16,68	17,00	32,63
7/3/2017	60,21	43,58	37,84	27,37	22,16	16,37	14,63	27,10
	61,74	42,68	37,00	27,11	22,00	16,37	18,05	28,79
14/3/2017	64,00	61,53	57,63	45,42	35,63	25,11	29,74	49,58
	64,68	60,16	56,42	42,84	34,26	26,05	23,89	51,11
4/2/2019	57,29	48,38	33,60	27,50	17,90	14,41	17,2	52,06
	59,99	47,09	28,84	24,35	17,90	15,84		
	58,62	49,60	35,09	26,11	21,05	19,41		
5/2/2019	53,37	44,78	47,09	35,84	18,64	15,04	15,76	36,98
	53,37	43,28	45,94	32,75	17,43	14,37		
	54,69	48,81	49,56	34,16	19,82	14,03		
5/2/2019	54,69	53,37	45,21	34,85	25,80	21,04	21,8§	57,2)
	53,37	49,60	40,58	33,77	23,35	19,59		
	58,60	53,37	45,85	36,30	25,93	23,09		
12/3/2019	57,68	42,89	33,40	25,01	18,50	17,45	14,41	49,22
	54,69	47,09	30,80	30,09	15,79	15,48	13,76	44,78
	59,99	52,99	39,58	29,49	17,20	13,09		
	61,36	50,85	39,24	30,26	22,48	14,29		
12/3/2019	61,36	48,38	36,98	30,85	22,06	20,94	19,72	69,54
	59,99	49,6	35,84	31,46	22,71	18,74	18,56	68,41
	64,12	61,36	46,24	35,73	24,35	20,23		
	67,01	59,99	49,29	39,87	27,04	20,90		

Zu Abbildung 40: Wertangabe in %

Konz. In µM	Area in %	Konz. In µM	Area in %
0,01	20,95	5	45,63
0,01	21,16	5	47,37
0,01	29,11	5	63,16
0,01	25,84	5	56,21
0,01	18,05	5	36,63
0,01	17,00	5	37,89
0,01	14,63	5	43,58
0,01	18,05	5	42,68
0,01	29,74	5	61,53
0,01	23,89	5	60,16
0,1	19,95	10	51,63
0,1	16,68	10	52,89
0,1	16,37	10	72,74
0,1	16,37	10	66,42
0,1	25,11	10	42,05
0,1	26,05	10	42,37

0,5	19,21	10	60,21
0,5	20,11	10	61,74
0,5	22,16	10	64,00
0,5	22,00	10	64,68
0,5	35,63		
0,5	34,26		
1	29,74		
1	29,32		
1	37,58		
1	37,79		
1	25,00		
1	24,47		
1	27,37		
1	27,11		
1	45,42		
1	42,84		
2,5	42,53		
2,5	38,00		
2,5	53,21		
2,5	51,05		
2,5	31,32		
2,5	33,42		
2,5	37,84		
2,5	37,00		
2,5	57,63		
2,5	56,42		

7 Literaturverzeichnis

Abdalla, Maha; Thompson, LeeAnn; Gurley, Erin; Burke, Samantha; Ujjin, Jessica; Newsome, Robert; Somanath, Payaningal R. (2015): Dasatinib inhibits TGF β -induced myofibroblast differentiation through Src-SRF Pathway. In: *European journal of pharmacology* 769, S. 134–142. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.11.008.

Akhmetshina, Alfiya; Dees, Clara; Pileckyte, Margarita; Maurer, Britta; Axmann, Roland; Jüngel, Astrid et al. (2008): Dual inhibition of c-abl and PDGF receptor signaling by dasatinib and nilotinib for the treatment of dermal fibrosis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (7), S. 2214–2222. DOI: 10.1096/fj.07-105627.

Au, B. K.; Au, M. A.; Chien, J. W. (2011): Bronchiolitis obliterans syndrome epidemiology after allogeneic hematopoietic cell transplantation. In: *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 17 (7), S. 1072–1078. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.11.018.

Bai, Ge; Bee, Jared S.; Biddlecombe, James G.; Chen, Quanmin; Leach, W. Thomas (2012): Computational fluid dynamics (CFD) insights into agitation stress methods in biopharmaceutical development. In: *International Journal of Pharmaceutics* 423 (2), S. 264–280. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.11.044.

Banga, I. (2004): Der Effekt der schwachen organischen Säuren auf die Rattenschwanz-Kollagenfasern von jungen und alten Tieren. In: *Gerontology* 1 (6), S. 325–346. DOI: 10.1159/000210712.

Bayan, Christopher; Levitt, Jonathan M.; Miller, Eric; Kaplan, David; Georgakoudi, Irene (2009): Fully automated, quantitative, noninvasive assessment of collagen fiber content and organization in thick collagen gels. In: *J Appl Phys* 105 (10), S. 102042. DOI: 10.1063/1.3116626.

Bell, E.; Ivarsson, B.; Merrill, C. (1979): Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (3), S. 1274–1278.

Bogatkevich, Galina S.; Ludwicka-Bradley, Anna; Silver, Richard M. (2009): Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (11), S. 3455–3464. DOI: 10.1002/art.24935.

Dallon, John C.; Ehrlich, H. Paul (2008): A review of fibroblast-populated collagen lattices. In: *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 16 (4), S. 472–479. DOI: 10.1111/j.1524-475x.2008.00392.x.

Distler, Jörg H. W.; Jüngel, Astrid; Huber, Lars C.; Schulze-Horsel, Ursula; Zwerina, Jochen; Gay, Renate E. et al. (2007): Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. In: *Arthritis and rheumatism* 56 (1), S. 311–322. DOI: 10.1002/art.22314.

Durand, Michel; Favard, Pierre (1970): Die Zelle. Braunschweig: Vieweg (Reihe Biologie).

Eckes, B.; Krieg, T.; Nusgens, B. V.; Lapière, C. M. (1995): In vitro reconstituted skin as a tool for biology, pharmacology and therapy: a review. In: *Wound repair and regeneration : official*

publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 3 (3), S. 248–257. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1995.30304.x.

Eckes, B.; Zigrino, P.; Kessler, D.; Holtkötter, O.; Shephard, P.; Mauch, C.; Krieg, T. (2000): Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 19 (4), S. 325–332.

Ehrlich, H. Paul; Gabbiani, Giulio; Meda, Paolo (2000): Cell coupling modulates the contraction of fibroblast-populated collagen lattices. In: *J Cell Physiol* 184 (1), S. 86–92. DOI: 10.1002/(sici)1097-4652(200007)184:1<86::aid-jcp9>3.0.co;2-5.

Elsdale, T.; Bard, J. (1972): Collagen substrata for studies on cell behavior. In: *The Journal of cell biology* 54 (3), S. 626–637.

Fachinformation Dasatinib: SPRYCEL® Filmtabletten. Online verfügbar unter <https://fi.b-ms.de/Sprycel-Filmtabletten>, zuletzt geprüft am 26.08.2020.

Fachinformation Imatinib: FI_Imatinib_Stand 042018. Online verfügbar unter https://www.accord-healthcare.de/sites/default/files/2018-07/FI_Imatinib_Stand%20042018.pdf, zuletzt geprüft am 26.08.2020.

Fachinformation Nilotinib: Tasigna® 50 mg/200 mg Hartkapseln. Online verfügbar unter <https://www.fachinfo.de/pdf/010623>, zuletzt geprüft am 26.08.2020.

García-Gareta, Elena (2014): Collagen gels and the 'Bornstein legacy'. From a substrate for tissue culture to cell culture systems and biomaterials for tissue regeneration. In: *Experimental dermatology* 23 (7), S. 473–474. DOI: 10.1111/exd.12404.

Gelatine – Eigenschaften, Herstellung und molekulare Struktur (2020.000Z). Online verfügbar unter <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/gelatine/gelatine.htm#Literatur;>, zuletzt aktualisiert am 03.05.2020.000Z, zuletzt geprüft am 03.05.2020.

Gillery, P.; Maquart, F. X.; Borel, J. P. (1986): Fibronectin dependence of the contraction of collagen lattices by human skin fibroblasts. In: *Experimental cell research* 167 (1), S. 29–37.

Grinnell, F.; Zhu, M.; Carlson, M. A.; Abrams, J. M. (1999): Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. In: *Experimental cell research* 248 (2), S. 608–619. DOI: 10.1006/excr.1999.4440.

Grinnell, Frederick; Petroll, W. Matthew (2010): Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. In: *Annual review of cell and developmental biology* 26, S. 335–361. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113318.

GROSS, J.; KIRK, D. (1958): The heat precipitation of collagen from neutral salt solutions. Some rate-regulating factors. In: *The Journal of biological chemistry* 233 (2), S. 355–360.

Haubeiss, Silke; Schmid, Jens O.; Mürdter, Thomas E.; Sonnenberg, Maike; Friedel, Godehard; van der Kuip, Heiko; Aulitzky, Walter E. (2010): Dasatinib reverses cancer-associated fibroblasts (CAFs) from primary lung carcinomas to a phenotype comparable to that of normal fibroblasts. In: *Molecular cancer* 9, S. 168. DOI: 10.1186/1476-4598-9-168.

Hochhaus, Andreas (2007): Dasatinib for the treatment of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia after imatinib failure. In: *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 8 (18), S. 3257–3264. DOI: 10.1517/14656566.8.18.3257.

Holtzhauer, Martin (2006): Basic Methods for the Biochemical Lab. First English Edition. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Springer Lab Manuals).

Incelligence: Automatische Zellzählungsgeräte. Casy. Online verfügbar unter <https://www.incelligence.de/zellkultur/zellzaehlung/zellzaehlungs-geraete>.

Jin, Jin; Togo, Shinsaku; Kadoya, Kotaro; Tulafu, Miniwan; Namba, Yukiko; Iwai, Moe et al. (2019): Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- β 1. In: *Respiratory research* 20 (1), S. 119. DOI: 10.1186/s12931-019-1093-z.

Jonas, Oliver; Duschl, Claus (2010): Force propagation and force generation in cells. In: *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67 (9), S. 555–563. DOI: 10.1002/cm.20466.

Kadivar, Ali; Noordin, Mohamed Ibrahim; Aditya, Arya; Kamalidehghan, Behnam; Davoudi, Ehsan Taghizadeh; Sedghi, Reihaneh; Javar, Hamid Akbari (2019): Corrigendum Antiproliferative effects of imatinib mesylate on ZR-75-1 and MDA-MB-231 cell lines via PDGFR- β , PDGF-BB, c-Kit and SCF expression. In: *Int J Mol Med* 43 (5), S. 2259. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4119.

Kantarjian, Hagop; Giles, Francis; Wunderle, Lydia; Bhalla, Kapil; O'Brien, Susan; Wassmann, Barbara et al. (2006): Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. In: *The New England journal of medicine* 354 (24), S. 2542–2551. DOI: 10.1056/NEJMoa055104.

Krebs, Rainer; Tikkanen, Jussi M.; Nykänen, Antti I.; Wood, Jeanette; Jeltsch, Michael; Ylä-Herttuala, Seppo et al. (2005): Dual role of vascular endothelial growth factor in experimental obliterative bronchiolitis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 171 (12), S. 1421–1429. DOI: 10.1164/rccm.200408-1001OC.

Liu, X. D.; Umino, T.; Ertl, R.; Veys, T.; Skold, C. M.; Takigawa, K. et al. (2001): Persistence of TGF-beta1 induction of increased fibroblast contractility. In: *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 37 (3), S. 193–201. DOI: 10.1290/1071-2690(2001)037<0193:POTIOI>2.0.CO;2.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *The Journal of biological chemistry* 193 (1), S. 265–275.

Mikami, Yu; Matsuzaki, Hirotaka; Takeshima, Hideyuki; Makita, Kosuke; Yamauchi, Yasuhiro; Nagase, Takahide (2016): Development of an In Vitro Assay to Evaluate Contractile Function of Mesenchymal Cells that Underwent Epithelial-Mesenchymal Transition. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (112). DOI: 10.3791/53974.

Miller, Edward J.; Rhodes, R.Kent: Preparation and Chracterization of the different Types of Collagen. In: SidneyP. Colowick und Nathan O. Kaplan (Hg.): *Methods in Enzymology. Structural and contractile Proteins*. Unter Mitarbeit von Leon W. Cunningham und Dixie W. Frederiksen (82), S. 33–64.

Ngo, Peter; Ramalingam, Punitha; Phillips, Jonathan A.; Furuta, Glenn T. (2006): Collagen gel contraction assay. In: *Methods Mol Biol* 341, S. 103–109. DOI: 10.1385/1-59745-113-4:103.

Nowak, Elisabeth; Kammerer, Sarah; Küpper, Jan-Heiner (2018): ATP-based cell viability assay is superior to trypan blue exclusion and XTT assay in measuring cytotoxicity of anticancer drugs Taxol and Imatinib, and proteasome inhibitor MG-132 on human hepatoma cell line HepG2. In: *Clinical hemorheology and microcirculation* 69 (1-2), S. 327–336. DOI: 10.3233/CH-189120.

Rhee, Sangmyung (2009): Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. In: *Experimental & molecular medicine* 41 (12), S. 858–865. DOI: 10.3858/emm.2009.41.12.096.

Rittié, Laure (2017): Type I Collagen Purification from Rat Tail Tendons. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1627, S. 287–308. DOI: 10.1007/978-1-4939-7113-8_19.

Robert L. Ehrmann (1956): The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen<xref ref-type="fn" rid="fn1">2</xref>. In: *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. DOI: 10.1093/jnci/16.6.1375.

Schafer, Marissa J.; White, Thomas A.; Iijima, Koji; Haak, Andrew J.; Ligresti, Giovanni; Atkinson, Elizabeth J. et al. (2017): Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. In: *Nature communications* 8, S. 14532. DOI: 10.1038/ncomms14532.

SDS-Page.

Selman, M.; King, T. E.; Pardo, A. (2001): Idiopathic pulmonary fibrosis. Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. In: *Annals of internal medicine* 134 (2), S. 136–151. DOI: 10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015.

Silveira, Elaine; Cavalcante, Isadora Pontes; Kremer, Jean Lucas; Mendonça, Pedro Omeri Ribeiro de; Lotfi, Claudimara Ferini Pacicco (2018): The tyrosine kinase inhibitor nilotinib is more efficient than mitotane in decreasing cell viability in spheroids prepared from adrenocortical carcinoma cells. In: *Cancer cell international* 18, S. 29. DOI: 10.1186/s12935-018-0527-x.

Steinberg, B. M.; Smith, K.; Colozzo, M.; Pollack, R. (1980): Establishment and transformation diminish the ability of fibroblasts to contract a native collagen gel. In: *The Journal of cell biology* 87 (1), S. 304–308.

Suesskind-Schwendi, M. von; Heigel, E.; Pfahler, S.; Haneya, A.; Schmid, C.; Hirt, S. W.; Lehle, K. (2016): Protective function of pirfenidone and everolimus on the development of chronic allograft rejection after experimental lung transplantation. In: *Histology and histopathology* 31 (7), S. 793–805. DOI: 10.14670/HH-11-712.

Suesskind-Schwendi, Marietta von; Hirt, Stephan W.; Diez, Claudius; Ruemmele, Petra; Puehler, Thomas; Schmid, Christof; Lehle, Karla (2012): Impact of the severity of acute rejection in the early phase after rat lung transplantation on the effectiveness of mycophenolate mofetil to treat chronic allograft rejection. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 42 (1), S. 142–148. DOI: 10.1093/ejcts/ezr277.

Tikkanen, Jussi M.; Hollmén, Maria; Nykänen, Antti I.; Wood, Jeanette; Koskinen, Petri K.; Lemström, Karl B. (2006): Role of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in obliterative airway disease. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 174 (10), S. 1145–1152. DOI: 10.1164/rccm.200601-044OC.

Tsukahara, Rintaro; Umazume, Kazuhiko; Yamakawa, Naoyuki; McDonald, Kevin; Kaplan, Henry J.; Tamiya, Shigeo (2015): Dasatinib affects focal adhesion and myosin regulation to inhibit matrix contraction by Müller cells. In: *Exp Eye Res* 139, S. 90–96. DOI: 10.1016/j.exer.2015.07.019.

Umazume, Kazuhiko; Liu, Lanhsin; Scott, Patrick A.; Castro, Juan P. Fernandez de; McDonald, Kevin; Kaplan, Henry J.; Tamiya, Shigeo (2013): Inhibition of PVR with a tyrosine kinase

inhibitor, dasatinib, in the swine. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54 (2), S. 1150–1159. DOI: 10.1167/iovs.12-10418.

Waters, David W.; Blokland, Kaj E. C.; Pathinayake, Prabuddha S.; Burgess, Janette K.; Mutsaers, Steven E.; Prele, Cecilia M. et al. (2018): Fibroblast senescence in the pathology of idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 315 (2), L162-L172. DOI: 10.1152/ajplung.00037.2018.

Yilmaz, Oznur; Oztay, Fusun; Kayalar, Ozgecan (2015): Dasatinib attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 33 (5-6), S. 366–375. DOI: 10.3109/08977194.2015.1109511.

Yunliang Chen; Andrew Leask; David J. Abraham; Daphne Pala; Xu Shiwen; Korsia Khan et al. (2008): Heparan sulfate-dependent ERK activation contributes to the overexpression of fibrotic proteins and enhanced contraction by scleroderma fibroblasts. In: *Arthritis & Rheumatism* 58 (2), S. 577–585. DOI: 10.1002/art.23146.

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2015 bis Dezember 2020 an der Klinik und Poliklinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Christof Schmid angefertigt. Ein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. Karla Lehle für die Überlassung dieses Themas. Sie unterstützte mich mit ihrem Fachwissen bei der Planung, Durchführung und Interpretation der Versuche und motivierte mich, wenn es nötig war.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich für die großartige und unermüdliche Unterstützung bei Karin Hollnberger, Christina Leykauf und Katrin Bielenberg, die mir als MTA´s im Labor das Knowhow zur Durchführung dieser experimentellen Studie beigebracht haben.

Ein weiterer besonderer Dank an meinen Partner Christoph der mit seinem „dritten Auge“ Kritik in die Arbeit einwarf, neue Ideen einbrachte und immer für mich da war, ganz besonders in den schwierigen, frustrierenden Momenten.

Außerdem möchte ich mich bei allen weiteren Menschen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet haben und sich geduldig den Frust über zwischenzeitliche Fehlschläge angehört haben, allen voran meiner Familie, sowie Antje und André.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Inhalte dieser Arbeit wurden bislang nicht veröffentlicht.

Regensburg, den 31.05.2021

Anett Kräuter

9 Lebenslauf

Name: Kräuter
 Vorname: Anett
 Geburtsdatum/-ort: 29.01.1986 in Saalfeld/Saale

Berufliche Tätigkeit

Seit 07/2020 Assistenzärztin für Allgemeinmedizin, Kliniken Hochfranken Naila, Abteilung für Akutgeriatrie
 01/2019 -06/2020 Assistenzärztin für Allgemeinmedizin, Kreiskrankenhaus Schleiz, Abteilung für Innere Medizin
 03/2012 - 09/2012 Fachliche Leitung Ergotherapie, VitaLenz GmbH Reichenbach
 11/2010 - 09/2012 Kundenmanagerin (Kaufland Limbach-Oberfrohna)
 10/2008 - 10/2010 Vertriebsmitarbeiterin Kasse und Verkauf (Kaufland Rudolstadt)
 01/2008 - 09/2008 Ergotherapeutin, Praxis Ernst Barthel Erlangen
 08/2002 - 12/2007 Vertriebsmitarbeiterin Kasse und Verkauf (Kaufland Rudolstadt)

Berufsausbildung

2004 - 2007 Ausbildung zur staatlich anerkannten Ergotherapeutin (ESO Pößneck)
 2012 - 2018 Studium der Humanmedizin Universität Regensburg

Schulbildung

1992 - 1996 Grundschule „Wilhelm Pieck“ Rudolstadt
 1996 - 2004 Gymnasium Fridericianum Rudolstadt